

Aus der Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Der Einfluss der Gravitation auf humane Chondrozyten –  
Tissue Engineering des Knorpels**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. medic.

(doctor rerum medicarum)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von **Ganna Aleshcheva**

aus Jewpatorija (Krim)

**Magdeburg 2015**

Angefertigt von **November 2012 bis Mai 2015** in der Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie, Arbeitsgruppe von Professor Daniela Grimm

**Klinikdirektor:**     **Herr Professor Dr. med. Manfred Infanger**

**Betreuer:**            **Frau Professor Dr. med. Daniela Grimm** (Universität Aarhus, Dänemark)  
                             **Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Ruth Hemmersbach** (DLR Köln)  
                             **Herr Professor Dr. med. Manfred Infanger**

**Datum der Verteidigung: 7.12.15**

## Bibliographische Beschreibung:

Aleshcheva, Ganna:

Der Einfluß der Gravitation auf humane Chondrozyten – Tissue Engineering des Knorpels. – 2015. – 107 Bl., 35 Abb., 2 Tab.

## Kurzreferat

Knorpel ist ein druckfestes Stützgewebe, das aufgrund seines einzigartigen Aufbaus eine beschränkte Regenerationskapazität besitzt. Die Knorpelregeneration stellt somit eine Herausforderung für Mediziner dar, die sich immer noch auf der Suche nach einer optimalen, standardisierten und minimal invasiven Methode befinden.

Die Kultivierung von Knorpelzellen unter veränderten Schwerkraft- und simulierten Mikrogravitationsbedingungen in Bodenanlagen, wie beispielsweise der Random Positioning Machine, dem zweidimensionalen schnelldrehenden Klinostaten und der Rotating Wall Vessel, stellt eine neue Strategie für das Tissue Engineering des Knorpels dar. Die reale Mikrogravitation während eines Parabelfluges und auch die simulierte Mikrogravitation beeinflussen das Wachstum, die Morphologie und die Physiologie der Knorpelzellen, die ihr Zytoskelett, ihr Genexpressionsprofil und ihren Proteingehalt unter diesen Bedingungen ändern. Diese Veränderungen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht.

Chondrozyten sind wie Fibroblasten, Endothel- und Karzinomzellen in der Lage, in simulierter Mikrogravitation dreidimensionale Aggregate (multizelluläre Sphäroide, Gewebestückchen) ohne Zusatz von Trägermaterialien zu bilden. Unter Verwendung eines geeigneten Mediums können sich diese Aggregate bei längerer Kultivierungszeit zu knorpelähnlichem Gewebe ausbilden. Dieses Gewebe und die unter Mikrogravitation gezüchteten Knorpelzellen wurden für diese Doktorarbeit molekularbiologisch, histologisch und immunhistochemisch untersucht. Darüber hinaus wurde die weitere mögliche Verwendung des produzierten Gewebes in der regenerativen Medizin diskutiert.

## **Schlüsselwörter**

*Knorpel, Random Positioning Machine, Rotating Wall Vessel, zweidimensionaler schnelldrehender Klinostat, Chondrozyten, Mikrogravitation, Simulation der Mikrogravitation*

**Die vorliegende Doktorarbeit basiert auf den folgenden chronologisch geordneten Publikationen:**

1. **Aleshcheva G**, Sahana J, Ma , Hauslage J, Hemmersbach R, Egli M, Infanger M, Bauer J, Grimm D: Changes in morphology, gene expression and protein content in chondrocytes cultured on a Random Positioning Machine. PlosOne. 8. e79057 (2013)
2. **Aleshcheva G**, Sahana J, Ma X, Hauslage J, Hemmersbach R, Egli M, Infanger M, Bauer J, Grimm D: Moderate alterations of the cytoskeleton in human chondrocytes after short-term microgravity produced by parabolic flight maneuvers could be prevented by upregulation of BMP-2 and SOX-9. FASEB J. [In Press] (2015)

**Diese Publikation ist die Titelgeschichte der Juni Ausgabe von FASEB J.**

3. **Wehland M\***, **Aleshcheva G\***, Schulz H, Saar K, Hübner N, Hemmersbach R, Braun M, Ma X, Frett T, Warnke E, Riwaldt R, Pietsch P, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D: Differential gene expression of human chondrocytes cultured under short-term altered gravity conditions during parabolic flight maneuvers. Cell Commun. Signal 13. 18 (2015)

\* Gleiche Beteiligung an der Publikation

4. **Aleshcheva G**, Bauer J, Hemmersbach R, Egli M, Grimm D: Tissue engineering of cartilage on ground-based facilities. Microgravity Sci. Technol. [In Press]



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>Vorwort .....</b>	<b>3</b>
<b>Zielsetzung .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Biologie des Knorpels .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Chondrozyten .....	6
1.1.1.1 Das Zytoskelett der Chondrozyten.....	6
1.1.1.2 Die Extrazelluläre Matrix (EZM) der Chondrozyten.....	8
1.1.2 Knorpelarten.....	9
1.1.2.1 Zonen des hyalinen Knorpels.....	10
<b>1.2 Aktuelle klinische Knorpelregenerationsverfahren .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Arthroskopisches Debridement und Lavage .....	12
1.2.2 Arthroskopische Mikrofrakturierung .....	13
1.2.3 Abrasionsplastik .....	13
1.2.4 Mosaikplastik .....	14
1.2.5 Offene Knorpelzelltransplantation (ACT).....	14
1.2.6 Arthroskopische Knorpelzelltransplantation .....	15
<b>1.3 Bodenanlagen zur Simulation der Mikrogravitation .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 2D schnelldrehender Klinostat (Fast-Rotating Clinostat (FRC)) .....	16
1.3.2 3D Random Positioning Machine (RPM) .....	17
1.3.3 Rotating Wall Vessel (RWV).....	17
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Geräte .....	18
2.1.1.1 2D Fast-Rotating Clinostat (FRC) .....	19
2.1.1.2 3D Random Positioning Machine (RPM).....	19
2.1.1.3 Rotating Wall Vessel (RWV) .....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.3 Chemikalien .....	21
2.1.4 Antikörper .....	23
2.1.5 Lösungen für die Western Blot Analyse .....	23
2.1.6 Oligonukleotide (Primer) für die real-time quantitative PCR .....	24
2.1.7 ELISA Kits.....	26
2.1.8 Chondrozyten .....	27
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Zellkulturtechnik .....	28

2.2.1.1	Aussaat der Zellen in Kulturflaschen.....	28
2.2.1.2	Subkultivieren der Zellen.....	28
2.2.1.3	Herstellung von Zell-Kryokulturen.....	28
2.2.2	Gewinnung vom Zellmaterial.....	29
2.2.2.1	RPM- und Klinostat-Versuche.....	29
2.2.2.2	RWV-Versuche.....	29
2.2.3	DLR Parabelflug-Experimente.....	29
2.2.3.1	Ablauf eines Parabelfluges.....	30
2.2.3.2	Zellfixierung .....	30
2.2.4	Hypergravitationsexperimente .....	31
2.2.5	Vibrationsexperimente .....	31
2.2.6	Mikroskopie .....	32
2.2.7	Western Blot Analyse.....	32
2.2.7.1	Zelllysis.....	32
2.2.7.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	33
2.2.7.3	Reduktion der Proben .....	33
2.2.7.4	Auftrennung der Proteine.....	33
2.2.7.5	Western Blot Analyse .....	33
2.2.7.6	Membranentwicklung .....	34
2.2.8	qPCR Untersuchungen .....	34
2.2.8.1	RNA Isolation .....	34
2.2.8.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
2.2.8.3	cDNA-Synthese .....	35
2.2.8.4	Quantitative real-time PCR.....	35
2.2.9	ELISA.....	36
2.2.10	Microarray Genuntersuchungen.....	37
2.2.11	Histologische Untersuchungen und Vitalitätsprüfung.....	37
2.2.12	Immunhistologische Untersuchungen .....	37
2.2.13	F-Aktin Färbung mittels Rhodamin-Phalloidin.....	38
2.2.14	Indirekte Immunfluoreszenz.....	38
2.2.15	Detektion der Apoptose.....	38
2.2.16	Statistik.....	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von simulierter Mikrogravitation auf Chondrozyten.....</b>	<b>40</b>
3.1.1	Einfluss von RPM-Exposition auf Chondrozyten .....	41
3.1.2	Einfluss von FRC-Exposition auf Chondrozyten .....	47
<b>3.2</b>	<b>Veränderungen von Chondrozyten unter realer Kurzzeit-Schwerelosigkeit.....</b>	<b>49</b>

3.2.1	Zytoskelett-Veränderungen in der Schwerelosigkeit .....	49
3.2.2	Genexpressions- und Proteinveränderungen in der Schwerelosigkeit .....	53
3.2.3	Genexpressionsveränderungen durch Hypergravitation und Vibration .....	56
<b>3.3</b>	<b>Tissue Engineering des Knorpels .....</b>	<b>58</b>
3.3.1	Vergleich der Bodenanlagen .....	59
3.3.2	3D Knorpelgewebebildung in der RWV .....	60
3.3.2.1	Größe der in der RWV gebildeten Sphäroide .....	60
3.3.2.2	Zellmorphologie.....	61
3.3.2.3	Immunhistochemische Untersuchungen der gebildeten Sphäroide .....	62
3.3.2.4	Nachweis von apoptotischen Zellen im Sphäroid.....	62
3.3.2.5	Rekultivierung von Sphäroiden unter normalen Schwerkraftbedingungen .....	64
3.3.3	3D Knorpelgewebebildung auf der RPM.....	64
3.3.3.1	Morphologie der Chondrozyten.....	64
3.3.3.2	Größe der auf der RRM gebildeten Sphäroide.....	65
3.3.3.3	Immunhistochemische Analyse der Sphäroide .....	66
3.3.3.4	Knorpelzonen.....	67
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Einfluss der Mikrogravitation auf die Chondrozyten.....</b>	<b>69</b>
4.1.1	Der Einfluss der simulierten Mikrogravitation auf die Chondrozyten .....	70
4.1.2	Der Einfluss der Kurzzeit-Mikrogravitation auf die Chondrozyten.....	72
4.1.3	Der Einfluss der Hypergravitation und Vibration auf Chondrozyten.....	75
<b>4.2</b>	<b>Tissue Engineering des Knorpels .....</b>	<b>77</b>
4.2.1	Tissue Engineering des Knorpels in der RWV.....	78
4.2.2	Tissue Engineering des Knorpels auf der RPM .....	79
<b>4.3</b>	<b>Perspektiven der Knorpelregeneration in der Mikrogravitation.....</b>	<b>80</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>81</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	98
7.2	Tabellenverzeichnis .....	99
<b>Acknowledgement .....</b>		<b>100</b>
<b>Vorträge und Publikationen.....</b>		<b>101</b>
<b>Erklärung.....</b>		<b>104</b>
<b>Darstellung des Bildungsweges .....</b>		<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<i>ACTB</i>	Beta-Actin Gen
<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 3
<i>BMP2 (BMP-2)</i>	Bone Morphogenetic Protein 2 Gen
<i>BMP4 (BMP-4)</i>	Bone Morphogenetic Protein 4 Gen
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>CAV2</i>	Caveolin 2 Gen
<i>CCNA2</i>	Cyclin-A2
CGM	Chondrocyte Growth Medium
cDNA	Complementary DNA
<i>COL2</i>	Collagen type 2 Gen
<i>CTGF</i>	Connective Tissue Growth Factor Gen
d	Day (Tag)
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
<i>EDN1</i>	Endothelin-1
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal Calf Serum
FGF9	Fibriblast growth factor 9
FGF17	Fibriblast growth factor 17
FRC	2D Fast-Rotating Clinostat (Klinostat)
GF	Growth Factors
h	Hour (Stunde)
HARV	High Aspect-Ratio Vessel
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
<i>HMGB1</i>	High-mobility Group Protein B1 Gen
<i>ICAM1 (ICAM-1)</i>	Intercellular Adhesion Molecule 1 Gen
IF	Intermediärfilamente
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
<i>IL6</i>	Interleukin-6 Gen

<i>IL8</i>	Interleukin-8 Gen
<i>IL15</i>	Interleukin-15 Gen
<i>ITGA10</i>	Integrin alpha 10 Gen
<i>ITGB1</i>	Integrin beta 1 Gen
<i>KRT</i>	Zytokeratin Gen
min	Minute(n)
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NASA	National Aeronautics and Space Administration
<i>NOTCH2</i>	Neurogenic locus notch homolog protein 2 Gen
<i>OPN</i>	Osteopontin Gen
P	Parabel
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEP	Pepstatin A
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>PRKAA</i>	Protein Kinase AMP-activated $\alpha$ 1 Gen
<i>PRKCA</i>	Protein Kinase C alpha Gen
RT	Raumtemperatur
RPM	Random Positioning Machine
RWV	Rotating Wall Vessel
(s-) $\mu$ g	(Simulierte) Mikrogravitation
SAHC	Short-Arm Human Centrifuge
<i>SOX-5 (SOX5)</i>	SRY-related HMG-box 5 Gen
<i>SOX-6 (SOX6)</i>	SRY-related HMG-box 6 Gen
<i>SOX-9 (SOX9)</i>	SRY-related HMG-box 9 Gen
<i>TUBB</i>	Beta-Tubulin Gen
<i>TGF-B1 (TGFB1)</i>	Transforming Growth Factor beta 1 Gen
<i>TNFA</i>	Tumor Necrosis Factor alpha
V	Vibration
<i>VEGFA</i>	Vascular Endothelial Growth Factor A Gen
VEGFD	Vascular Endothelial Growth Factor D
<i>VIL2</i>	Ezrin Gen
<i>VIM</i>	Vimentin Gen
WB	Western Blot
<i>WNT5A</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A

## **Vorwort**

Die vorliegende Doktorarbeit umfasst Experimente, deren Auswertung in der Zeit zwischen November 2012 und März 2015 an der Universitätsklinik (Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie) der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg stattgefunden hat. Die Experimente an den Bodenanlagen (3D Random Positioning Machine, 2D schnell-drehender Klinostat und Rotating Wall Vessel) wurden an der Universität Aarhus in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Daniela Grimm durchgeführt, wo ich über die Hälfte der Doktorarbeitszeit verbracht habe.

Durch die Zugehörigkeit zur 2. Generation der SpaceLife Doktoranden des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt und die Finanzierung durch die Helmholtz Gesellschaft konnte ich die Untersuchungen zum Einfluss von Hypergravitation auf humane Chondrozyten im DLR (Köln) an der Kurz-Arm Humanzentrifuge (SAHC) durchführen. Im DLR erfolgten auch die Experimente auf dem 2D schnell-drehendem Klinostat und der Vibraplex Maschine (zur Untersuchung der Vibrationseinflüsse) unter der Betreuung von Frau PD Dr. Ruth Hemmersbach.

Die Einflüsse der kurzzeitigen realen Mikrogravitation auf die humanen Knorpelzellen (Projekt: [http://www.dlr.de/rd/desktopdefault.aspx/tabid-2285/3423\\_read-39377/](http://www.dlr.de/rd/desktopdefault.aspx/tabid-2285/3423_read-39377/)) wurden im Februar 2014 nach erfolgreicher Experimentbegutachtung während der 24. DLR Parabelflugkampagne (durchgeführt durch die Firma NOVESPACE) in Bordeaux (Flughafen Bordeaux-Mérignac, Frankreich) erforscht.

### **Betreuer der Doktorarbeit:**

#### **Professor Dr. med. Manfred Infanger**

Direktor der Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie  
Universitätsklinik der Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg, Deutschland

#### **Professor Dr. med. Daniela Grimm**

Professorin für Weltraummedizin  
Institut für Biomedizin, Pharmakologie, Universität Aarhus  
Aarhus, Dänemark

#### **PD Dr. rer. nat. Ruth Hemmersbach**

Leiterin der Abteilung Biomedizinische Forschung  
Institut für Luft und Raumfahrtmedizin  
Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt  
Köln, Deutschland

### **Mentor:**

#### **Dr. rer. nat. Jens Hauslage**

Abteilung Biomedizinische Forschung  
Institut für Luft und Raumfahrtmedizin  
Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt  
Köln, Deutschland

## Preface

The present doctoral thesis includes experiments conducted during November 2012 – May 2015 at the University Hospital (Clinic for Plastic, Aesthetic and Hand Surgery) of the Otto-von-Guericke-University (Magdeburg, Germany). Experiments involving ground-based facilities such as the Random Positioning Machine, 2D Fast-Rotating Clinostat and Rotating Wall Vessel were performed at the Aarhus University (Aarhus, Denmark) in the laboratories of Professor Daniela Grimm, where I spent around 50 % of my PhD time.

As doctoral student of the second generation of the SpaceLife Program of the German Aerospace Centre and with financial support by the Helmholtz Society, I was able to perform the experiments focusing on the influences of hypergravity on human chondrocytes on the Short-Arm Human Centrifuge (SAHC) at the German Aerospace Centre (DLR) in Cologne. The experiments on the 2D Fast-Rotating Clinostat and Vibraplex (for investigation of vibration influences on human chondrocytes) were also conducted at the DLR.

The studies on the influences of short-term real microgravity on human chondrocytes (Project: [http://www.dlr.de/rd/desktopdefault.aspx/tabid-2285/3423\\_read-39377/](http://www.dlr.de/rd/desktopdefault.aspx/tabid-2285/3423_read-39377/)) were done after successful experiment evaluation during the 24<sup>th</sup> DLR Parabolic Flight Campaign operated by the company NOVESPACE in February 2014 in Bordeaux at the airport of Bordeaux-Mérignac (France).

### Supervisors:

#### **Professor Manfred Infanger, MD**

Director of the Clinic for Plastic, Aesthetic and Hand Surgery  
University Hospital Magdeburg  
Otto-von-Guericke-University (Magdeburg, Germany)

#### **Professor Daniela Grimm, MD**

Professor of Space Medicine  
Institute of Biomedicine, Pharmacology  
Aarhus University (Aarhus, Denmark)

#### **Privatdozent Ruth Hemmersbach, PhD**

Group leader of the Biomedical Research Department  
Institute of Aerospace Medicine  
German Aerospace Centre (Cologne, Germany)

### Mentor:

#### **Jens Hauslage, PhD**

Biomedical Research Department  
Institute of Aerospace Medicine  
German Aerospace Centre (Cologne, Germany)

## **Zielsetzung**

Die vorliegende Promotionsschrift untersucht die Veränderungen von humanen Chondrozyten (Knorpelzellen), die unter modifizierten Gravitationsbedingungen gezüchtet worden sind. Die Arbeit wurde in mehrere Abschnitte unterteilt, deren Ergebnisse bereits teilweise publiziert wurden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, wie sich die Knorpelzellen bei Kultivierung auf der Random Positioning Machine (RPM), einem Gerät zur Simulation von Mikrogravitation, verhalten. Dabei wurden insbesondere morphologische Veränderungen des Zytoskeletts, die Genexpression sowie der Gehalt an extrazellulären Matrixproteinen nach Kultivierung für 30 min, 2, 4, 16 und 24 h unter simulierter Mikrogravitation untersucht.

Im zweiten Abschnitt der Dissertation sollten diese Resultate mit denen unter realer Mikrogravitation erzielten Ergebnissen verglichen werden. Dafür wurden die Chondrozyten in einem Inkubator, der in ein Parabelfluggarage eingebaut war, während der 24. DLR Parabelflugkampagne im Februar 2014 an Bord eines Parabelflugzeuges geflogen und nach der ersten und der letzten Parabel fixiert. Da die Mikrogravitationsphase während eines Parabelfluges von zwei Hypergravitationsphasen und den Vibrationen des Flugzeugs begleitet wird, wurden die Effekte von Vibration und Hypergravitation auf humane Chondrozyten während dieser Arbeit separat am Boden untersucht. Dabei sollte geprüft werden, ob die beobachteten Zellveränderungen tatsächlich durch Mikrogravitation zustande gekommen waren.

Im dritten Teil der Doktorarbeit wurden die in zwei unterschiedlichen Simulationsanlagen (RPM und 2D schnell-drehender Klinostat (FRC)) erzielten Ergebnisse miteinander verglichen. Es sollte geprüft werden, ob es unterschiedliche Effekte auf die Chondrozyten in Abhängigkeit der Simulationsmethode gibt.

Im vierten Abschnitt der Arbeit wurden Chondrozyten von sechs verschiedenen Spendern in drei unterschiedlichen Medien auf der Random Positioning Machine bis zu vier Wochen lang kultiviert. Die gebildeten „Zellaggregate“ bzw. knorpelähnlichen Gewebestückchen wurden jeweils aus dem Medium isoliert, fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten, histologisch und immunhistochemisch untersucht. Darüber hinaus wurden Veränderungen des Zytoskeletts und der Extrazellulären Matrix (EZM) sowie die Genexpression und der Proteingehalt der Gewebestücke näher studiert.

Im fünften und abschließenden Abschnitt der Doktorarbeit wurden die Chondrozyten in der von der NASA-entwickelten Rotating Wall Vessel kultiviert. Die erzielten Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen der RPM-Versuche verglichen.



# 1. Einleitung

## 1.1 Biologie des Knorpels

### 1.1.1 Chondrozyten

Knorpelzellen (Chondrozyten) nehmen ihren Ursprung von Chondroblasten, die aus den mesenchymalen Zellen stammen, und sind der einzige Zelltyp, der im Knorpel eines gesunden Menschen vorzufinden ist (Salomon et al. 2008). Sie machen ungefähr 1-10 % des gesamten Knorpelvolumens aus (Hensler 2009). Chondrozyten liegen einzeln oder in kleinen Gruppen (Chondronen) in den Knorpelhöhlen bzw. in der extrazellulären Matrix, die überwiegend aus dem für die Struktur verantwortlichen Kollagen Typ II und dem knorpelspezifischen Proteoglykan (Aggrecan) besteht und diese von der Umgebung abgegrenzt (Salomon et al. 2008).

Während die Kollagene für die elastischen Eigenschaften und die Zugfestigkeit des Knorpels verantwortlich sind (Salomon et al. 2008), bestimmen die Proteoglykane die viskoelastischen Eigenschaften und die Druckfestigkeit des Knorpels (Jurvelin et al. 2000; Kempson et al. 1970; Bader et al. 1994). Kollagen Typ II hat mit ungefähr 90-95 % den größten Anteil an den Kollagenfibrillen, die extrem stark sind und einen enormen Belastungswiderstand besitzen. Die Proteoglykane werden von den Chondrozyten produziert und bestehen aus einem Kernprotein, welches mit multiplen sulfatierten Polysaccharideinheiten, den Glykosaminoglykanen, verbunden ist. Diese sind aufgrund ihres hohen Wasserbindungsvermögens für die Druckelastizität des Moleküls zuständig (Salomon et al. 2008).

Das Proteoglykan Aggrecan hat zwei verschiedene Glykosaminoglykanketten: Das Chondroitinsulfat und das Keratansulfat (Ulrich-Vinther et al. 2003). Jedes Aggrecan enthält 100 Chondroitinsulfatketten und bis zu 60 Keratansulfatketten. Die N-terminale Domäne enthält ein Protein mit einer sehr hohen Affinität zu Hyaluronsäure und einem kleinen Glykoprotein als Bindungsprotein, welches die Bindung zwischen der Hyaluronsäure und dem Aggrecan stabilisiert (Ulrich-Vinther et al. 2003). Jede Hyaluronsäurekette kann viele Aggrecan-Moleküle binden und bewirkt so den typischen Aufbau der Proteoglykane (Ulrich-Vinther et al. 2003).

Die Knorpelzellen sind mit den üblichen Zellorganellen ausgestattet. Sie verfügen über einen gut ausgebildeten Golgi-Apparat und reichlich raues endoplasmatisches Retikulum (Salomon et al. 2008). Die Versorgung der Chondrozyten erfolgt über das Perichondrium (Knorpelhaut) und die Synovia (Gelenkschmiere) (Salomon et al. 2008).

#### 1.1.1.1 Das Zytoskelett der Chondrozyten

Das Zytoskelett der Chondrozyten besteht aus einem dreidimensionalen Protein-Netzwerk, das aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten (IF) zusammengesetzt ist (Benjamin et al 1994, Durrant et al. 1999).

Bei den Mikrofilamenten handelt es sich um Polymere aus  $\beta$ -Aktin-Untereinheiten (Benjamin et al 1994), deren Mikrofibrillen sich in der Zellperipherie (Zellrinde) befinden und dort ein stabiles

Netzwerk bilden (Durrant et al. 1999, Langelier et al. 1999, Trickley et al. 2004). Die Mikrofilamente verleihen der Zelloberfläche eine mechanische Stabilität, spielen eine Rolle bei den Zellenverformungen und beim intrazellulären Transport (Trickley et al. 2004). Bei deren Beeinträchtigung kommt es zur Veränderung der Beziehung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Chondrozytenkern (Trickley et al. 2004). Daher kann angenommen werden, dass Aktin teilweise für die Übermittlung der mechanischen Zellverformung durch die Zellmembran hindurch verantwortlich ist (Trickley et al. 2004).

Die Mikrotubuli bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten, die sich zu 13 longitudinalen Reihen zusammenlagern und dabei Tubulindimere bilden, die Kopf-zu-Schwanz entlang der Längsachse des Mikrotubulus angeordnet sind. Dieses führt zu einer funktionalen Polarisierung (Benjamin et al 1994). Innerhalb der Zelle breiten sich die Mikrotubuli im gesamten Zytoplasma ausgehend vom Mikrotubuli-organisierenden Zentrum aus (Benjamin et al 1994, Langelier et al. 1999, Trickley et al. 2004). Dieses Zentrum entspricht einem Zentriol in der Nähe des Zellkerns (Durrant et al. 1999, Trickley et al. 2004). Mikrotubuli spielen die Hauptrolle bei der Verteilung der Organellen, Zilienbewegungen, intrazellulärem Transport sowie bei der Zellteilung (Benjamin et al 1994), indem sie die Lokalisation des Golgi-Apparats und des endoplasmatischen Retikulums bestimmen. Ihre Integrität innerhalb der Chondrozyten ist für die Synthese und die Sekretion von Kollagenen und Proteoglykanen von großer Bedeutung (Benjamin et al 1994).

Die Intermediärfilamente (IF) (u. a. Vimentin und Zytokeratin) sind besonders in den Chondrozyten der mittleren Gelenkknorpelzone anzutreffen (Eggli et al. 1988), wo sie sich oft zu dichten Wirbeln zusammenlagern, die große Teile des Zytoplasmas vereinnahmen. Sie bilden Netzwerke an der Kortex und um den Nukleus herum (Durrant et al. 1999) oder sind durch das gesamte Zytosol hindurch und von definierten Filamenten in Kernnähe verteilt (Trickley et al. 2004). Sie werden als mechanische Integratoren des intrazellulären Raums betrachtet, weil sie zusammen mit anderen Elementen des Zytoskeletts einen Teil des mechanischen Transduktionssystems bilden, womit die Zellen auf externe Kräfte antworten und Veränderungen der äußeren Umgebung wahrnehmen (Benjamin et al 1994). Auf eine starke Belastung reagieren sie mit einer Versteifung des Netzwerks (Trickley et al. 2004), wobei der IF-Gehalt der Chondrozyten als Antwort auf mechanische Belastungen gesteigert wird, was ihr Antreffen in den gewichttragenden Bereichen des Gelenkknorpels erklärt. Es könnte auch eine Korrelation der IFs mit den Komponenten der extrazellulären Matrix in verschiedenen Knorpeltiefen bestehen (Benjamin et al 1994).

Chondrozyten exprimieren eine Vielfalt an Integrin-Untereinheiten, wobei die Expression heterogen und abhängig vom Abstand zur Gelenkoberfläche erfolgt (Salter et al. 1992). Die unterschiedliche Expression der Zytokeratine hängt möglicherweise mit den verschiedenen Integrintypen der Zellmembran von Knorpelzellen und der Natur der perizellulären Matrix zusammen (Salter et al. 1992).

Das Zytoskelett ist sowohl für die Zellform, für die Bewegung von Zellen und Organellen als auch die Zellteilung und den intrazellulären Transport von Bedeutung (Benjamin et al 1994). Auch aufgrund der mechanischen und biomechanischen Eigenschaften einer Zelle, sowie ihrer Wechselwirkungen mit der umliegenden Matrix spielt das Zytoskelett eine wichtige Rolle (Guilak und Mow, 2000). Beschädigung des Zytoskeletts durch chemische Agenzien ändert die mechanischen Zelleigenschaften (Trickley et al. 2004). Eine Zerstörung der Mikrotubuli führt zu keiner großen Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften der Chondrozyten (Trickley et al. 2004).

#### **1.1.1.2 Die Extrazelluläre Matrix (EZM) der Chondrozyten**

Die EZM stellt ein Netzwerk aus Makromolekülen dar, die auf unterschiedliche Art entstehen bzw. abgebaut werden. Dieser Remodelingprozess wird durch Zellrezeptoren, die an bestimmte Komponenten der EZM binden, oder durch die Expression von Genen in den Zellen reguliert. Die Interaktion zwischen der EZM und den Zellen resultiert somit in Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation sowie im Aufbau, Umbau und Abbau von Gewebe, wobei vor allem die Matrix Metalloproteinasen (MMP) für den Abbau und Umbau der EZM verantwortlich sind.

Die EZM der Chondrozyten besteht zu etwa 60 % aus Kollagenen, zu 20-25 % aus Proteoglykanen, sowie zu 15-25 % aus nicht-kollagenen Proteinen und Glykoproteinen. Die Hauptaufgabe der EZM ist die Aufrechterhaltung der mechanischen Eigenschaften des Knorpels. Zudem erfolgt die Übertragung von mechanischen Signalen von der Matrix auf die Chondrozyten während einer belastungsbedingten Matrixverformung. Innerhalb der EZM unterscheidet man drei verschiedene Matrixarten (die perizelluläre, die territoriale und die interterritoriale Matrix), die sich in Aufbau und Zusammensetzung unterscheiden. Die perizelluläre und die territoriale Matrix sind für die Verbindung der Zellmembran mit den Matrixmolekülen verantwortlich und schützen daher die Zellen vor Schädigungen während der Belastung und Deformation des Gewebes.

Wenn die Gelenkoberfläche unter Belastung komprimiert wird, kommt es zum Flüssigkeitsausstrom aus der Matrix, was eine Veränderung des Ionengleichgewichtes und damit des osmotischen Druckgradienten bewirkt und zu einem gesteigerten Fluss von Stoffwechselprodukten führt. Experimentelle Studien zeigten, dass eine abnorme Ruhigstellung des Gelenkes die Konzentration der Proteoglykane und das Ausmaß der Aggregation verändert, wodurch wiederum die mechanischen Eigenschaften beeinflusst werden (Buckwalter 1995). Bei Wiederaufnahme der Belastung werden die mechanischen Eigenschaften normalisiert. Die Aufrechterhaltung der Knorpelzusammensetzung ist somit von Bewegung und Belastung abhängig (Buckwalter 1995).

Zu Beginn einer arthrotischen Knorpeldegeneration kommt es zum Zerbrechen des Matrix-Netzwerkes auf Molekularebene. Initial erfolgt eine Erhöhung des Wassergehaltes, die durch eine Abnahme der Molekülgröße bedingt ist. Beim Alterungsprozess kommt es zu einer Umbildung in der Zusammensetzung der Matrix, der Aktivität der Knorpelzellen und zu einer Abnahme der

Reaktionsfähigkeit auf Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren. Diese Veränderungen tragen zu einer Steigerung der degenerativen Prozesse im Knorpel bei (Guerne et al. 1995).

Die EZM bestimmt außerdem die Form einer Zelle und steht mit der Zelle bzw. mit ihrem Zytoskelett in wechselseitiger Interaktion, indem Zytoskelett und EZM ein Gerüst ausbilden, das durch Druck und Spannung zusammengehalten wird. Somit wird durch äußere Einflüsse nicht nur das Zytoskelett, sondern auch die EZM beansprucht. Es wird postuliert, dass die ganze Zelle als „Schwerkraftsensor“ fungiert, was zur Veränderung der Zellform, einer Neuordnung zellulärer Strukturen oder einer veränderten Signalweitergabe innerhalb der Zelle führen kann (Ingber 1999, Ingber 2003(a), Ingber 2003(b)).

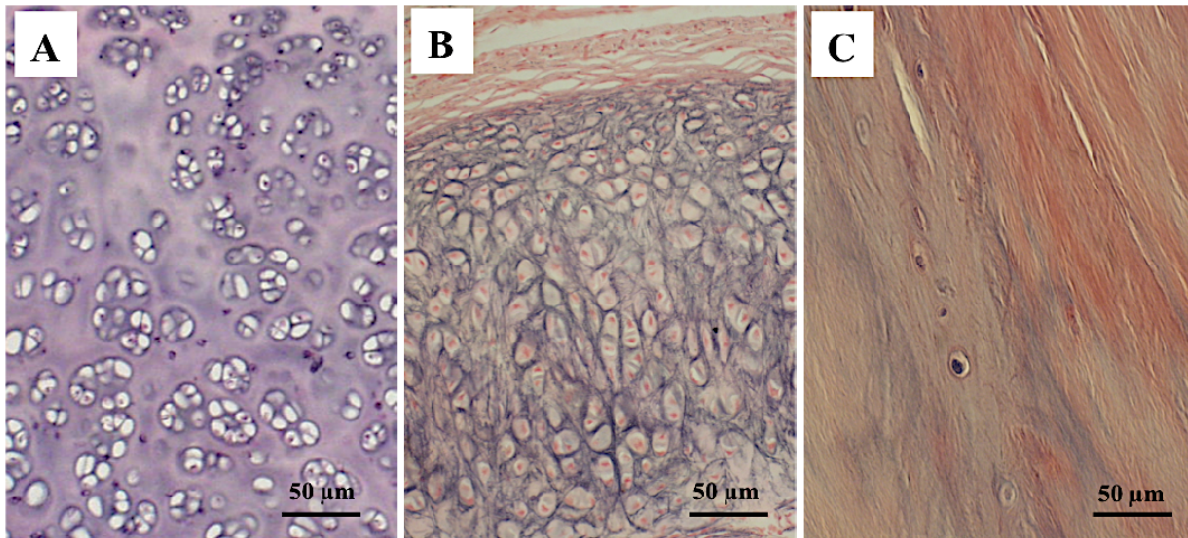
### **1.1.2 Knorpelarten**

Der Knorpel ist ein druckfestes Stützgewebe, das aufgrund seines Aufbaus sowie physikalischer und chemischer Eigenschaften eine Mittelstellung zwischen Binde- und Knochengewebe einnimmt (Salomon et al. 2008). Man unterscheidet zwischen hyalinem Knorpel, elastischem Knorpel und Faserknorpel (Abb. 1), die sich nach der Art der innerhalb der Matrix eingebetteten Proteinfasern differenzieren und an die jeweilige Funktion angepasst sind.

Hyaliner Knorpel ist die häufigste Knorpelart, die in der Nase, den Ohren, der Luftröhre, am Kehlkopf und in den Bronchien vorzufinden ist (Salomon et al. 2008). Außerdem deckt der hyaline Knorpel die Knochengelenkflächen ab, wo er eine stoßdämpfende Funktion übernimmt. Adulter hyaliner Gelenkknorpel ist eine anervale, alymphatische und avaskuläre Matrix, die von den Chondrozyten synthetisiert wird (Bruns et al. 2000). Im hyalinen Knorpel sind die Proteinfasern groß und bestehen überwiegend aus Kollagen. Die optische Dichte dieser Fasern ist gleich der Dichte der Grundsubstanz, die sie umgibt (Salomon et al. 2008), was dazu führt, dass die Kollagenfasern in der extrazellulären Matrix nicht sichtbar sind (Abb. 1A). Somit erscheint der hyaline Knorpel als einheitliches, glänzendes Gewebe mit gleichmäßig verteilten Chondrozyten (Salomon et al. 2008).

Den elastischen Knorpel findet man in den eustachischen Röhren, am Kehldeckel und an den Ohr läppchen. Er besteht aus den in die Grundsubstanz eingebetteten elastischen Fasern, die deutlich sichtbar sind, was ihn leicht vom hyalinen Knorpel unterscheiden lässt (Abb. 1B).

Der Faserknorpel ist eine Knorpelart mit schichtweise angeordneten Kollagenfasern (Abb. 1C). Im Gegensatz zu dem sehr einheitlichen Aussehen des hyalinen Knorpels (Abb. 1A) besitzt der Faserknorpel eine schwammartige Struktur mit Lücken zwischen den Lacunae und Kollagenfaserbündeln (Salomon et al. 2008). Diese Struktur verleiht dem Faserknorpel stoßdämpfende Eigenschaften an Schambeinfugen und Bandscheiben.



**Abbildung 1: Knorpelarten**

**A. Hyaliner Knorpel** (Quelle: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Neuroanatomie, Kurs der mikroskopischen Anatomie, Histo Online-Kurs, Bild Nr.thema04/4\_4.html, hyaliner Knorpel);

**B. Elastischer Knorpel** (Quelle: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Neuroanatomie, Kurs der mikroskopischen Anatomie, Freiburger Histokurs, Bild 02-05-05.html?id=028a40x, Elastischer Knorpel, Ohr, Mensch, neugeboren, ELASTIKA-KERNECHTROT, 40x);

**C. Faserknorpel** (Quelle: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Neuroanatomie, Kurs der mikroskopischen Anatomie, Histo Online-Kurs, Bild Nr.thema04/29a/40.jpg, Faserknorpel, Discus intervertebralis, Rind/Mensch, HE, 40x).

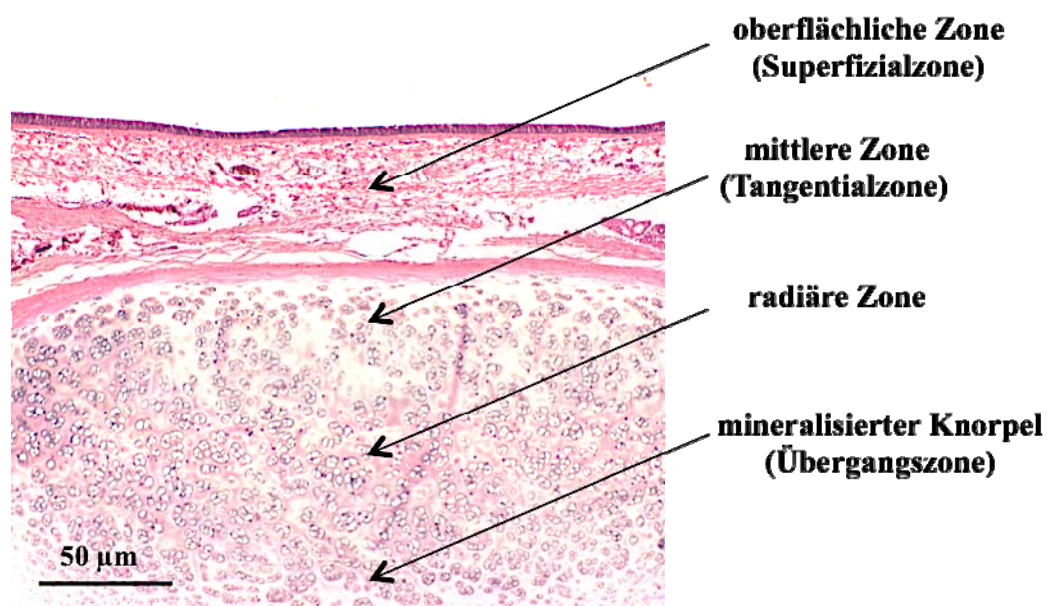
Die Erlaubnis zur Publikation dieser Abbildung haben mir Frau Professor Roussa und Herr Professor Aertsen (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) erteilt.

### 1.1.2.1 Zonen des hyalinen Knorpels

Der hyaline Knorpel wird in verschiedene Zonen eingeteilt, die sich in Größe, Form der Zellen, Orientierung zur Gelenkfläche und der metabolischen Aktivität unterscheiden (Ulrich-Vinther et al. 2003, Abb. 2). Die oberflächliche Zone (Superficialzone), die dünnste Zone des Knorpels, bildet die Gelenkoberfläche und hat den höchsten Zellgehalt (Ulrich-Vinther et al. 2003). In dieser Zone liegen die Chondrozyten einzeln als inaktive, abgeplattete Zellen vor (Ulrich-Vinther et al. 2003), während sie in der radiären Zone in Gruppen von 5-8 Zellen zusammen liegen (Hunziker et al. 2002). In der wesentlich dickeren mittleren Zone (Tangentialzone) runden sich die Zellen langsam ab, bis sie in der Radiärzone ganz rund und in Säulen angeordnet sind (Bruns et al. 2000). Die Radiärzone ist die breiteste Zone des Knorpels, in der die Proteoglykan-Konzentration am höchsten und der Wassergehalt am niedrigsten sind. Diese Zone wird von der Zone des mineralisierten Knorpels (Übergangszone) durch die sogenannte Tidemark abgegrenzt (Bruns et al. 2000). Die Tidemark zeichnet sich durch einen höheren Calciumgehalt aus und stellt sich in der Histologie als basophile Linie dar (Bruns et al. 2000). Die Tidemark ist nicht komplett geschlossen: In ihr befinden sich

Lücken, die einen Austausch von ernährenden Substanzen zwischen dem kalzifizierten und dem unkalzifizierten Knorpel ermöglichen (Greenwald et al. 1969).

Die Chondrozyten in der Zone des mineralisierten Knorpels besitzen weniger Organellen und die umgebende Matrix enthält Calciumphosphatkristalle (Rudert et al. 1998). Die Zellen in der oberen Hälfte der mineralisierten Zone sind deutlich größer als die Chondrozyten in den anderen Schichten. Sie liegen immer noch in Gruppen zusammen, allerdings nicht in Säulenformation. Die Chondrozyten in der unteren Hälfte der mineralisierten Zone sind kleiner als in der oberen Hälfte. Sie liegen zufällig verteilt und bilden keine Gruppen mehr. Auffällig in dieser Schicht ist, dass die Zellen viele Löcher enthalten. Die Zellmembran erscheint unterbrochen, besonders bei den Zellen, die sehr dicht am subchondralen Knochen liegen und scheinen einem degenerativen Prozess zu unterliegen (Brighton et al. 1984). Die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Knorpelzonen betreffen nicht die Struktur der Chondrozyten, sondern die Zellaktivität (Aydelotte et al. 1988). Die Chondrozyten in der Radiärzone sind bis zu zehn Mal aktiver als die in der Superficialzone.



**Abbildung 2: Zonen des hyalinen Knorpels**

Hyaliner Knorpel (Quelle: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Neuroanatomie, Kurs der mikroskopischen Anatomie, Histo Online-Kurs, Bild Nr.thema04/4\_4.html, hyaliner Knorpel). Die Erlaubnis zur Publikation dieser Abbildung haben mir Frau Professor Roussa und Herr Professor Aertsen erteilt (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg).

## 1.2 Aktuelle klinische Knorpelregenerationsverfahren

Durch fehlende Blutversorgung besitzt der Knorpel eine sehr begrenzte Regenerationskapazität (Bruns et al. 2000). Der verletzte oder zerstörte Knorpel wächst in seiner ursprünglichen Form nicht wieder nach. Stattdessen bildet sich bei unbehandelten Knorpelschäden ein minderwertiges

Narbengewebe aus, das weder die funktionellen, biomechanischen noch die mikroskopischen Eigenschaften von gesundem Gelenkknorpel besitzt (Steadman et al. 2001). Wegen seiner weichen Struktur wird es meist nach kurzer Zeit wieder abgerieben, was häufig vorzeitige Gelenkabnutzungen zur Folge hat, die letztendlich zu Schmerzen, Belastungsunfähigkeit und Arthrose führen können (Steadman et al. 2001).

Ursachen für traumatische Knorpelschäden sind Verletzungen oder Unfälle (z.B. beim Sport), wobei oft eine enorme Krafteinwirkung auf das Gelenk entsteht. Schwere traumatische Knorpelschäden treten häufig auch bei frischer vorderer Kreuzbandruptur oder Kniescheibenluxation auf (Siebold und Pässler 2009). Dabei bricht meist ein Stück des gesunden Knorpels aus der Gelenkfläche heraus und es entsteht ein chondrales oder sogar osteochondrales ‚Flake‘ (eine freie "Gelenkmaus") (Siebold und Pässler 2009). Der Verlust des Knorpelgewebes führt zusätzlich zu zahlreichen Krankheiten, von denen in erster Linie ältere, über- und auch untergewichtige Menschen betroffen sind.

Zur gelenkerhaltenden Behandlung wurden eine Vielzahl von operativen Verfahren und Therapiekonzepten entwickelt, die je nach Alter des Patienten, Gewicht, sowie Größe, Tiefe und Lokalisation der Defekte Anwendung finden. Abhängig von der Defektgröße wird entweder die Regeneration, d.h. das Selbstheilungspotenzial des Knorpels, angeregt oder der Defekt wird durch chirurgische Behandlung aufgefüllt. Die aktuellen chirurgischen Methoden zur Behandlung chondraler Defekte beinhalten die palliative Behandlung mit arthroskopischen Débridement und Lavage, die reparative Behandlung mit Mark-stimulierenden Techniken (Mikrofraktur), und die restaurative Behandlung, einschließlich ein osteochondrales Aufpfropfen und die autologe Chondrozyten-Implantation (Siebold und Pässler 2009). Größere Defekte können mit osteochondralen Allotransplanten oder mit der gesamten Gelenkarthroplastik bewältigt werden (Siebold und Pässler 2009). Zur Stabilisierung des Behandlungserfolges werden eine begleitende Physiotherapie, Trainingstherapie, Osteopathie und physikalische Therapie eingesetzt.

### **1.2.1 Arthroskopisches Debridement und Lavage**

Das arthroskopische Debridement ist ein komplexer Prozess, der die Entfernung von degenerativen und gerissenen Meniskusanteilen, die Abtragung und Glättung von sich ablösenden instabilen Knorpelstücken der Gelenkflächen, die Entfernung von freien Gelenkkörpern und die Entfernung entzündeter, schmerzhafter Gelenkschleimhaut (Synovia) in sich einschließt (Chang et al. 1993, Felson und Buckwalter 2002, Ogilvie-Harris und Fitsialos 1991). Die Befürworter der Methode beschreiben einen langfristig günstigen Effekt gegen das Fortschreiten einer Arthrose und eine langfristige Schmerzlinderung (Siebold und Pässler 2009).

Bei jeder Arthroskopie wird zunächst das Gelenk mit Spülflüssigkeit aufgefüllt, wobei eine Zirkulation über eine Spülkanüle erzeugt wird oder über einen Shaver die primäre Gelenkflüssigkeit abgesaugt wird. Befinden sich in der Gelenkflüssigkeit kleine Knorpelstücke (Debris) werden diese



im Rahmen der Arthroskopie aus dem Gelenk beseitigt (Siebold und Pässler 2009). Dieser Effekt wird auch als Lavage ("Auswaschen des Gelenkes") bezeichnet. Es wurde beschrieben, dass durch das Durchspülen des Gelenkes das Knie nicht nur von Debris, sondern auch von entzündlichen Enzymen befreit wird (Siebold und Pässler 2009). Von einer reinen Lavage wird allerdings abgeraten, da dadurch meist keine oder nur eine sehr kurzfristige Verbesserung der Beschwerden zu erwarten ist, die von einem Placebo-Effekt begleitet wird (Siebold und Pässler 2009). Die Lavage wird heute praktisch nur noch zusätzlich durchgeführt.

Nach schweren Knieverletzungen kann es zum Abreißen eines Knochen-Knorpel-Fragmentes aus der Gelenkfläche kommen. Wird rechtzeitig operiert, so können ausgerissene Knochen-Knorpel-Fragmente wieder an Ort und Stelle eingepasst und befestigt werden. Gelingt die Wiederherstellung der Gelenkfläche auf diese Art und Weise, so ist diese Methode in den meisten Fällen anderen Verfahren vorzuziehen.

### **1.2.2 Arthroskopische Mikrofrakturierung**

Die arthroskopische Mikrofrakturierung stellt ein knochenmarkstimulierendes Verfahren dar und wird bei kleineren Knorpelschäden bis auf den Knochen angewendet (Steadman et al. 1999, Steadman et al. 2001, Pässler 2000). Dabei soll das Gelenk angeregt werden, selbst neuen Knorpel zu bilden: Mit Hilfe einer spitz zulaufenden Ahle (Pfriem) werden kleine, zirka drei Millimeter tiefe Löcher in den Knochen im Bereich des Knorpeldefektes eingebracht, was zur Freisetzung bzw. zur Migration der Stammzellen aus dem darunterliegenden Knochenmark (Spongiosa) an die Knorpeldefektstelle führt (Steadman et al. 2001). In der Folge kommt es zu einer Einblutung aus dem Knochen in den Defektbereich und die Blutstammzellen haften an der Stelle der Mikrofrakturierung an. Um den neu entstehenden Knorpel zu schützen, müssen Betroffene das Gelenk für mindestens sechs Wochen entlasten. Dadurch differenzieren sich diese Stammzellen nach einigen Monaten zu Faserknorpel und füllen den umschriebenen Knorpeldefekt auf (Steadman et al. 1999, Steadman et al. 2001 Pässler 2000). Dies ermöglicht dem Patienten oftmals für einige Zeit eine weitgehende Schmerzfreiheit und Belastbarkeit.

Der Vorteil des Verfahrens ist, dass es unmittelbar bei der Arthroskopie angewendet werden kann. Von Nachteil ist es, dass leider nur Faserknorpel von minderwertiger Qualität entsteht (Bae et al. 2006, Kreuz et al. 2006), und die Defektstelle nach 18-24 Monaten wieder behandelt werden muss. Deshalb sollte die Indikation zur Mikrofrakturierung während der Operation genau bedacht werden.

### **1.2.3 Abrasionsplastik**

Eine Abrasionsplastik ist ein veraltetes Verfahren zur Knorpeltherapie. Dieses wird momentan selten durchgeführt und ist in der Regel nur bei kleineren Knorpelschäden bis auf den Knochen sinnvoll (Siebold und Pässler 2009). Hierbei wird bei der Arthroskopie mit einer Fräse der Restknorpel im Defektbereich bis auf die subchondrale Knochenschicht (die direkt unter dem Gelenkknorpel



liegende Schicht) abgetragen. Ähnlich der Mikrofrakturierung kommt es dann zur Ausschwemmung von Stammzellen in den Defektbereich und es kann ein Regenerat aus Faserknorpel entstehen (Siebold und Pässler 2009). Von Nachteil ist es ebenfalls, dass dabei nur Faserknorpel von minderwertiger Qualität entsteht (Siebold und Pässler 2009).

#### **1.2.4 Mosaikplastik**

Bei der Transplantation eines körpereigenen Knorpelknochenzylinders - Mosaikplastik (Bobi 1996, Bobic 2009) - wird der Knorpeldefekt mitsamt eines darunter liegenden Zylinders rundlich ausgestanzt und durch einen zweiten körpereigenen rundlichen Zylinder bis zu einem Zentimeter Durchmesser, der aus einer Region des Kniegelenkes entnommen wird, die nicht in der (Haupt-) Belastungszone des Gelenkes liegt, mit intakter Knorpeloberfläche ersetzt (Bobi 1996, Bobic 2009). Die Defektstelle in der Belastungszone des Kniegelenks wird mit dem "intakten" Zylinder aufgefüllt und die Entnahmestelle mit dem "defekten" Zylinder verschlossen. Im Idealfall ist nur ein Zylinder der Größe bis 12 mm Durchmesser zur Deckung des Knorpelschadens notwendig (Bobi 1996, Bobic 2009).

Das Verfahren ist anspruchsvoll, sehr sensibel und erfordert eine präzise Operation mit genauer Wiederherstellung des Gelenkknorpelniveaus (Siebold und Pässler 2009). Der Name "Mosaikplastik" rührt daher, dass bei größeren Defekten mehrere Zylinder nebeneinander in den Knorpeldefekt gesetzt werden müssen, sodass ein Mosaik entsteht.

Vorteil dieses Verfahrens ist es, dass es unmittelbar bei der Arthroskopie angewendet werden kann und gesunder intakter Knorpel in den Defektbereich eingebracht wird (Siebold und Pässler 2009). Es ist von Nachteil, dass die Knorpeldicke an verschiedenen Stellen des Gelenkes unterschiedlich ist und ein Niveauunterschied zu Folgeproblemen führen kann. In der Regel kommt diese Methode vor allem bei Knorpelschäden infolge von Unfällen zum Einsatz, zur Therapie einer Arthrose dagegen nur in Einzelfällen (Siebold und Pässler 2009).

#### **1.2.5 Offene Knorpelzelltransplantation (ACT)**

Bei fast allen heute üblichen Knorpeltransplantationsverfahren ist eine Eröffnung des Kniegelenkes (= Arthrotomie) notwendig (Siebold und Pässler 2009). Die körpereigenen angezüchteten Knorpelzellen werden dann entweder in flüssiger Form unter einen "Deckel", z.B. einem Periostlappen oder in einer Kollagenmatrix wieder in den Knorpeldefekt eingebracht (Siebold und Pässler 2009). Unter dieser Schutzhaut werden anschließend die Zellen eingespritzt, die dann beginnen neuen Gelenkknorpel zu bilden. Die Transplantation körpereigener Knorpelzellen ist vor allem für Patienten unter 65 Jahren geeignet oder für die Behandlung einer Arthrose, die noch nicht so weit fortgeschritten ist.

### 1.2.6 Arthroskopische Knorpelzelltransplantation

Ein von der Firma co.don® AG (Teltow, Berlin) entwickeltes Verfahren macht es seit 2006 möglich, die Implantation der Knorpelzellen auch minimal invasiv (arthroskopisch) durchzuführen (Thermann et al. 2007). Dazu wird zunächst ein nur wenige Millimeter großes Knorpelstück aus einem wenig belasteten Areal des Kniegelenkes für die Anzucht der Zellen entnommen. Die Knorpelzellen (12-48 Mio. Zellen) werden dann im Labor in Form von dreidimensionalen Kügelchen (Sphäroiden) auf Trägermaterialien (scaffolds) gezüchtet, wobei jedes einzelne Sphäroid etwa 200 000 Knorpelzellen enthält und je nach Reifegrad einen Durchmesser von nur 0.5-0.7 mm hat (Thermann et al. 2007). Die Herstellung der 3D-Sphäroide wird ausschließlich mit patienteneigenem Blut durchgeführt, wodurch Fremdeiweiße und Nebenwirkungen vermieden werden. Anschließend werden die Sphäroide an die Defektstelle eingebracht (Thermann et al. 2007).

Sobald die Sphäroide bei der Implantation mit dem vorbereiteten Knorpeldefektlager Kontakt aufnehmen, können sie durch Adhäsionsproteine mechanisch stabil am subchondralen Knochen anhaften (Thermann et al. 2007). Mittlerweile werden die Zellen routinemäßig in alle Bereiche des Kniegelenkes (Oberschenkelrolle, Schienbeinkopf und auch in den Bereich der Kniescheibe) transplantiert.

Diese Technik hat zwei Vorteile: Verwendung von patienteneigenen Zellen vermeidet potenzielle Autoimmunreaktionen oder virale Infektionen aus transplantierten allogenen Zellen oder Fremdstoffe (Thermann et al. 2007). Im Gegensatz zur autologen osteochondralen Transplantation (ACT) wird durch eine kleine Biopsie die Komplikationen für den Chondrozyten-Spender minimiert (Saris et al. 2008; Saris et al. 2009).

Die ACT hat aber auch wesentliche Nachteile: Komplexität des Vorgangs zugrund zwei Operationen, die durch eine lange Regenerationszeit (6-12 Monate) charakterisiert sind (Siebold und Pässler 2009). Die am häufigsten berichtete Nebenwirkung nach der ACT ist die auftretende Hypertrophie am Defekt (Peterson et al. 2000). Daher werden alternative Ansätze unter Verwendung künstlicher aus Kollagen Typ I und III oder Hyaluronsäure bestehender Matrizen entwickelt (Gooding et al. 2006; Gomoll et al. 2009; Marcacci et al. 2005).

Die Verwendung künstlicher bzw. fremder Trägermaterialien werden allerdings schnell zum Problem, weil diese aus dem hergestellten Gewebe nicht entfernt werden und somit eine Abstoßungsreaktion oder Folgeerkrankungen verursachen können. Vorläufige Studien haben außerdem gezeigt, dass autologe Chondrozyten in Kultur zu „Fibrochondrozyten“ dedifferenzieren (Darling et al. 2005). Eine Redifferenzierung und Expression der Chondrozyten-Marker erfolgt nach einer 3D Kultivierung (Martinez et al. 2008). Um das Verfahren der ACT zu standardisieren und die Wirtschaftlichkeit zu erhöhen, sind größere Studien erforderlich.

Eine mögliche Lösung dieser Probleme stellt die Kultivierung der Knorpelzellen in der Mikrogravitation dar, weil Chondrozyten gegen den durch Mikrogravitation verursachten Stress resistent sind und unter Mikrogravitationsbedingungen Sphäroide ohne Trägermaterialien bilden (Ulbrich et al. 2010). Dieses Verfahren wurde während dieser Doktorarbeit untersucht und beschrieben.

### **1.3 Bodenanlagen zur Simulation der Mikrogravitation**

Die Versuche unter realer Mikrogravitation im Weltall sind teuer und sehr zeitaufwendig. Jahrelange Vorbereitungs- und Wartezeiten auf die Weltraummission erschweren die Versuchsmöglichkeiten. Die Simulation der Mikrogravitation auf der Erde erlaubt mit Einschränkung das Erforschen von Zellen unter veränderten Schwerkraftbedingungen und dient so zur Vorbereitung von Weltraumexperimenten.

Es ist derzeit allerdings leider nicht möglich, alle Parameter der Schwerelosigkeit zu simulieren: Diffusionsverhältnisse, Durchmischung durch Konvektion und hydrostatischer Druck (Albrecht-Buehler 1992) wirken in den Bodenanlagen wie Klinostat oder Random Positioning Machine nicht anders als unter normalen Schwerkraftbedingungen. Vom Standpunkt der Zelle aus betrachtet, verändert sich der Schwerkraftvektor ständig und zwar in allen drei Dimensionen. Seine Summe eliminiert sich somit über die Zeit, was eine Aufhebung der gravitationsabhängigen Sedimentation je nach Operationsmodus der Anlage zur Folge hat. Der Begriff Mikrogravitation statt Schwerelosigkeit ist genau genommen korrekter, da Schwerelosigkeit im engeren Sinne (0g) auch auf einer Erdumlaufbahn nicht erreicht werden kann, denn auch hier müssen Kräfte eingesetzt werden, die den Körper auf der Umlaufbahn halten (Pickenhahn 2005). Um den theoretischen Zustand der Schwerelosigkeit zu erreichen, müsste ein Körper völlig außerhalb jeglicher Gravitationsquelle sein.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden drei Bodenanlagen (2D schnelldrehender Klinostat (FRC), Random Positioning Machine (RPM) und Rotating Wall Vessel (RWV)) zur Simulation von Mikrogravitation verwendet. FRC und RPM gehören zu den ESA (European Space Agency) Ground-Based Facilities (GBF). Heutzutage ist es noch nicht möglich mithilfe dieser Maschinen alle Aspekte der Mikrogravitation nachzuahmen. Allerdings stimmen einige der bisherigen gefundenen Effekte mit den Resultaten, die bei Weltraumflügen gewonnen wurden, in vielen Fällen überein (Ma et al. 2014).

#### **1.3.1 2D schnelldrehender Klinostat (Fast-Rotating Clinostat (FRC))**

Bereits im 17. Jahrhundert wurden zur Erforschung der Schwerkraft auf das Pflanzenwachstum Klinostaten verwendet (Klaus, 2001). Bei diesem Gerät erfolgt die Rotation um eine Achse, die senkrecht zur Erdanziehungskraft orientiert ist (Abb. 3A). Bei der so simulierten Mikrogravitation handelt sich um eine Mittelung des Schwerkraftvektors bei einer bestimmten

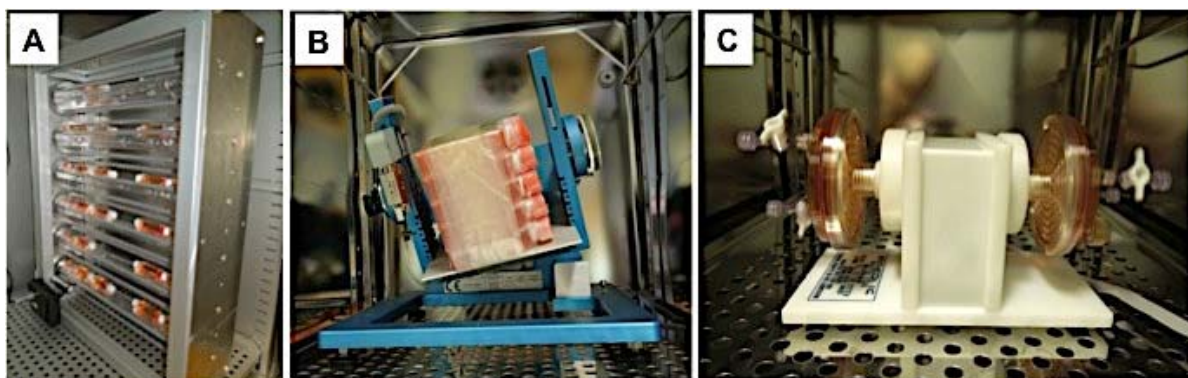
Rotationsgeschwindigkeit (40-100 rpm), wodurch die Zellen ganz in der Mitte zentriert werden (Briegleb 1992). Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit induziert Zentrifugalkräfte. Um eine optimale Simulation zu gewährleisten, werden nur kleine Zellen und Pflanzen rotiert werden, die sich exakt in der Rotationsachse des Klinostaten befinden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden daher die Zellen mit einem Durchmesser von 20  $\mu\text{m}$  exponiert und bei 60 rpm klinorotiert.

### 1.3.2 3D Random Positioning Machine (RPM)

Wie beim FRC wird die Mikrogravitation von der in den 90er Jahren entwickelten RPM durch Mittelung des Schwerkraftvektors erzielt. Diese erfolgt über alle drei Raumrichtungen. Die Rotation wird dabei mit zwei voneinander unabhängig beweglichen Rahmen ermöglicht (Hoson et al. 1997, Abb. 3B) und von einem Computer gesteuert, der die Orientierung bzw. Laufrichtung zufällig relativ zum Schwerkraftvektor verändert. Es wird angenommen, dass der zufällige Geschwindigkeits- und Richtungswechsel in simulierter Mikrogravitation resultiert und die Zellen auf den Schwerkraftvektor nicht mehr reagieren.

### 1.3.3 Rotating Wall Vessel (RWV)

In der von der NASA entwickelten RWV (Hammond et al. 2000) erfahren die Zellen in einer um eine Achse rotierenden Kammer, die luftblasenfrei mit Medium gefüllt ist, einen kontinuierlichen freien Fall (Abb. 3C). Die Fallgeschwindigkeit der Zellen kann durch die Einstellung der Rotationsgeschwindigkeit mit einem im Gerät integrierten Tachometer eingestellt werden. Da die Zellen in der Kammer in Suspension vorliegen und keine Zeit haben an der Oberfläche der Kammer adhären zu werden, ist ein dreidimensionales Wachstum möglich.



**Abbildung 3: Bodenanlagen zur Simulation der Mikrogravitation**

A. 2D Fast-Rotating Clinostat (Warnke et al. 2014); B. Random Positioning Machine (Aleshcheva et al. 2013); C. Rotating Wall Vessel

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### Gerät

ABI 7500 Fast Real-Time PCR System

Autoklav

Brutschrank HERA CELL 150i

ChemiDoc MP System

Digitalkamera EOS550D

Eismaschine Scotsman AF-80

Färbekammer „feucht“

Feinwaage 1602 MF

Gefrierschrank (-20 °C)

Gefrierschrank Thermo Forma (-80 °C)

Gelelektrophorese-Kammer

Heiz-/Rührplatte Ika Combimag Ret

2D schnell-drehender Klinostat

Konfokales Laserscan Mikroskop LSM710

Kühlschrank Küleg 0-15 °C

Kühlzentrifuge 5417 R

Küvetten Typ-Nr. 105.202-QS

Lichtmikroskop Olympus CK

Magnetrührer Combimag Rot

Mikrowelle

Phasenkontrastmikroskop

PH-Meter PHM 210

3D Random Positioning Machine

Rotating Wall Vessel

Saughilfen (Pipet boy – PIPETUS Standard)

Schüttler RM S

Spectrophotometer (Microplate Reader)

Sterilbank Hera Safe

##### Bezugsnachweis

Life Technologies, Darmstadt

Memmert, Schwabach

Thermo Fisher Scientific Inc.

Bio-Rad Laboratories, München

Canon, USA

COTECH, England

Eigenbau

Sartorius, Göttingen

Linde, Bad Hersfeld

ULT Klatt, Berlin

Bio-Rad Laboratories, München

Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau

DLR, Köln

Zeiss, Oberkochen

Münchhoff, Berlin

Eppendorf, Hamburg

Hellma, Müllheim

Olympus, Hamburg

IKA, Staufen

MICROMAT AEG, Zürich

Leica Microsystems A/S, Ballerup Denmark

Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne

Cedex, Frankreich

ADS, früher Dutch Space, Leiden,

Netherlands

Synthecon, Houston, Texas, USA

Carl Roth, Karlsruhe; Hirschmann

Laborgeräte, Eberstadt

CAT, Staufen

Shimadzu, Duisburg

Heraeus, Hanau

Stickstofftank CryoSystem 2000	Cryosolutions, Rheinberg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischwaage	Sartorius, Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Langensebold
Vibraplex-Plattform	DLR, Köln
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Wärmeschrank UT6 (37 °C)	Heraeus, Langensebold
Wärmeschrank (60 °C)	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Unitherm WA 15 Unitherm, Würzburg
Western Blot Transfer System Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad Laboratories, München
Western Blot System ChemiDoc™ MP	Bio-Rad Laboratories, München
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg

#### **2.1.1.1 2D Fast-Rotating Clinostat (FRC)**

Der 2D Fast-Rotating Clinostat (DLR, Köln) wurde mit jeweils 4 luftblasenfrei mit Zellkulturmedium gefüllten Flasketten auf jeder der 6 parallel rotierenden Achsen beladen (Abb. 3A). Das Gerät wurde in einen Brutschrank mit der Temperatur von 37 °C gestellt und mit einer konstanten Rotationsgeschwindigkeit von 60 rpm betrieben. Bei dieser Geschwindigkeit beträgt die maximale Restbeschleunigung 0,036g, kalkuliert am Rand der Flasketten (Eiermann et al. 2013). Die Ig-Kontrollen wurden im gleichen Inkubator platziert. Das Medium in den Flasketten wurde jeden zweiten Tag zu 50 % gewechselt.

#### **2.1.1.2 3D Random Positioning Machine (RPM)**

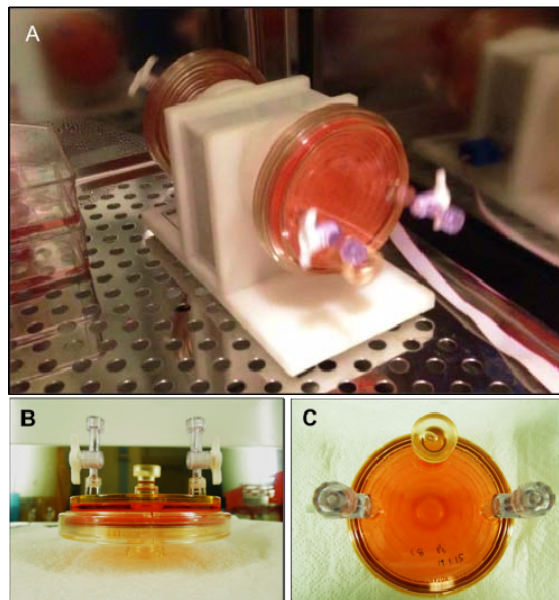
Zur Mikrogravitationssimulation wurde eine Random Positioning Machine (3D Klinostat), die von der Firma ADS (früher Dutch Space, Leiden, Niederlande) hergestellt wurde, benutzt (Abb. 3B). Die RPM bestand aus zwei unabhängig voneinander rotierenden Rahmen, die in orthogonal zueinander stehenden Rotationsachsen ausgerichtet waren. In der Mitte befand sich eine Platte, auf der die mit dem zu untersuchenden Probenmaterial gefüllten Kulturflaschen befestigt wurden. Um das Probenmaterial bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zu halten, wurde die RPM in einen Inkubator gestellt. Vor dem Inkubator befand sich der Computer für die Steuerung der RPM.

Während aller Versuche lief die RPM mit einer Geschwindigkeit von 60°/s im Real Random Mode. Auf dem Bildschirm ließen sich die Schwerkraftvektoren in allen drei Dimensionen ablesen, deren Summe im Idealfall 0 betragen sollte. Das Probenmaterial (subkonfluente Monolayer-Kulturen) befand sich in T25 Kulturflaschen (Sarstedt), die komplett mit Medium ohne Luftblasen gefüllt wurden, um die Scherkräfte so gut wie möglich zu minimieren. Parallel dazu wurden Bodenkontrollen (statische Ig-Kontrollen) im Inkubator neben der RPM angelegt. Das Medium in allen Kulturflaschen wurde jeden dritten Tag zu 50 % gewechselt.

### 2.1.1.3 Rotating Wall Vessel (RWV)

Die RWV ist eine einzigartige Zellkulturtechnologie, die von NASA entwickelt wurde und der erste Bioreaktor, der eine Kokultivierung der Zellen erlaubt (Abb. 3C, 4A).

Für die Tissue Engineering Experimente wurde das RCCS-2D System mit 50-ml HARV-Einweggefäßen (Synthecon Incorporated, Houston, TX, USA) verwendet (Abb. 4B, 4C). Die Zellen wurden zu jedem Einweggefäß (Vessel) unter sterilen Bedingungen in Suspension zugegeben. Die Gefäße wurden luftblasenfrei gefüllt. Die RWV wurde in den Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> platziert. Die Anfangsrotationsgeschwindigkeit betrug 10 rpm und wurde bis 20 rpm mit dem in das Gerät integrierten Tachometer erhöht, um die Zellen während der Kultivierung in Suspension zu halten (Marlovits et al. 2003(a)). Das Medium in jedem Einweggefäß wurde jeden dritten Tag zu 50 % gewechselt.



**Abbildung 4: Rotating Wall Vessel mit Zubehör**

RCCS-2D System (A) mit 50-ml HARV-Einweggefäßen (B – Bild von der Seite, C – Bild von oben).

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

#### Material

Deckgläschen

Flaskette® Nunc® Lab-Tek™

Illumina Beadchip

Kolbenhubpipetten (versch. Volumina)

Kryo-Röhrchen Cryovial® PK-100

Menzel-Gläser

Microtiterplatte (96-Well Optical Reaction Plate)

Optical Adhesive Covers

#### Bezugsnachweis

Menzel, Braunschweig

VWR International LLC

Illumina Inc., San Diego, CA, USA

Eppendorf, Hamburg

Simport, Kanada

Thermo Fisher Scientific Inc.

Life Technologies, Darmstadt

Life Technologies, Darmstadt

Parafilm M<sup>®</sup> (Plastic Packaging PM996)  
 PCR Softstrips 0,2 ml, 711030  
 Pipettenspitzen (versch. Größen)  
 Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)  
 Röhrchen (50 ml)  
 Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)  
 Super cell chamber slides  
 Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)  
 Zellschaber

Pechiney, Paris, Frankreich  
 Biozym Diagnostik, Oldendorf  
 Sarstedt, Nürnbrecht  
 Eppendorf, Hamburg  
 Sarstedt, Nürnberg  
 Sarstedt, Nürnberg  
 Becton Dickenson, Heidelberg  
 Sarstedt, Nürnberg  
 Sarstedt, Nürnberg

### 2.1.3 Chemikalien

#### Substanz

Acetat-Puffer  
 Aceton  
 Alcian Blau  
 AllPrep RNA/Protein Kit  
 Ammoniumperoxodisulfat (APS)  
 Blotting Grade Blocker (Non-Fat Dry Milk)  
 Bovines Serum Albumin  
 BSA Standard  
 Chondrocyte Growth Medium (CGM) basal  
 Citronensäure Monohydrat (99,5 %)  
 Clarity Western ECL Substrate  
 Criterion<sup>™</sup> TGX<sup>™</sup> Precast Gel  
 DAB Tabletten  
 Dimethylsulfoxid (DMSO)  
 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)  
 Entellan<sup>®</sup>  
 Essigsäure (1M)  
 Ethanol (verschiedene Konz.)  
 Fetales Kälberserum  
 Fetales Kälberserum für CGM  
 First-Strand cDNA Synthesis Kit  
 FragEL<sup>™</sup> DNA Fragmentation Detection Kit  
 Glycin (MG=75,07)  
 Hoechst 33342

#### Bezugsnachweis

Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
 Carl Roth, Karlsruhe  
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
 Qiagen, Hilden  
 Bio-Rad Laboratories, München  
 Bio-Rad Laboratories, München  
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
 Thermo Fisher Scientific Inc.  
 Provitro, Berlin  
 Carl Roth, Karlsruhe  
 Bio-Rad Laboratories, München  
 Bio-Rad Laboratories, München  
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
 Carl Roth, Karlsruhe  
 Life Technologies, Darmstadt  
 Merck Millipore, Schwalbach  
 Merck Millipore, Schwalbach  
 Carl Roth, Karlsruhe  
 Biochrom, Berlin  
 Provitro, Berlin  
 Thermo Fisher Scientific Inc.  
 Merck Millipore, Schwalbach  
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
 Life Technologies, Darmstadt



Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kulturmedium DMEM/F-12	Life Technologies, Darmstadt
2-Mercaptoethanol (99 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck Millipore, Schwalbach
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel	Bio-Rad Laboratories, München
Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Neutralrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd (20 %, 3 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphatpuffer (0,2 M)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rhodamin-Phalloidin	Life Technologies, Darmstadt
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Röti®-Quant universal	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure 32 % (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SYBR® Green Fast PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trans-Blot® Turbo Nitrocellulose Transfer Pack	Bio-Rad Laboratories, München
Trans-Blot® Turbo PVDF Transfer Pack	Bio-Rad Laboratories, München
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (1x) in HBSS	Life Technologies, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
3 % Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Katalognummer	Bezugsnachweis
<b>β-Tubulin</b>	1:1000 (WB) 1:100 (IIF)	2128S	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
<b>Vimentin</b>		5741S	
<b>Pan-keratin</b>		4545S	
<b>Integrin-β<sub>1</sub></b>		4706S	
<b>β-Actin</b>	1:1000 (WB)	3700S	
<b>Cleaved Caspase-3</b>		9664S	
<b>TGF-β<sub>1</sub></b>		3711S	
<b>PARP</b>		9542S	
<b>Osteopontin</b>	1:1000 (WB)	26395	Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, USA
<b>BMP-2</b>	1:100 (WB)	710022	Life Technologies, Darmstadt, Germany
<b>SOX-9</b>	1:500 (WB)	MA5-17177	
<b>ICAM-1</b>	1:500 (WB)	MA5407	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
<b>Aggrecan</b>	1:200 (WB)	PA5-32650	Millipore, Billerica, MA, USA
<b>Kollagen Typ I</b>	1:200 (WB)	MAB3391	
<b>Kollagen Typ II</b>	1:200 (WB)	MAB1330	

Sekundärantikörper	Verdünnung	Katalognummer	Bezugsnachweis
<b>Anti-Mouse (HRP)</b>	1:3000 (WB)	7076	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
<b>Anti-Rabbit (HRP)</b>		7074	
<b>Anti-Mouse</b>	1:50 (IIF)	4408	
<b>Anti-Rabbit</b>		4412	

### 2.1.5 Lösungen für die Western Blot Analyse

<b>Lysispuffer</b> (Lagerung bei +4 °C)	50 mM	Tris-HCl, pH 7,2
	150 mM	NaCl
	1 %	Triton X-100
	0,1 %	SDS (20 % Stock)
	Mit 100 ml dd H <sub>2</sub> O auffüllen	

<b>Block-Reagenz (1)</b> (Lagerung bei +4 °C)	2 %	Blotting Grade Blocker
	0,05 %	Tween
	Mit TBS-T auffüllen	

<b>Block-Reagenz (2)</b> (Lagerung bei +4 °C)	5 %	Bovine Serum Albumin
	0,05 %	Tween
	Mit TBS-T auffüllen	

<b>Elektrophorese- Laufpuffer</b> (Lagerung bei RT)	25 mM	Trizma Base
	192 mM	Glycin
	2,5 % (v/v)	SDS

<b>Tris-Puffer</b> (Lagerung bei RT)	5,85 g	NaCl
	12,11 g	Trizma Base
	10,17 g	Magnesiumchlorid
	Mit dd H <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen	

<b>10xTBS</b> (Lagerung bei RT)	61 g	Tris-HCl
	90 g	NaCl
	800 ml dd H <sub>2</sub> O, pH 7.6, 200 ml dd H <sub>2</sub> O	

<b>TBS-T</b> (Lagerung bei RT)	500 ml	TBS
	500 µl	Tween

### 2.1.6 Oligonukleotide (Primer) für die real-time quantitative PCR

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe von Primer Express<sup>®</sup> Software (Applied Biosystems, Darmstadt) designt ( $T_m$  ca. 60 °C) und von TIBMolbiol, Syntheselabor in Berlin hergestellt.

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
<b><i>18S</i></b>	18S-F	GGAGCCTGCGGCTTAATTT
	18S-R	CAACTAAGAACGGCCATGCA
<b><i>ACTA2</i></b>	ACTA2-F	GAGCGTGGCTATTCCTTCGT
	ACTA2-R	TTCAAAGTCCAGAGCTACATAACACAGT
<b><i>ACTB</i></b>	ACTB-F	TGCCGACAGGATGCAGAAG
	ACTB-R	GCCGATCCACACGGCGTACT
<b><i>BMP2</i></b>	BMP2-F	GACCTGTATCGCAGGCACTCA
	BMP2-R	TCGTTTCTGGTAGTTCTTCCAAAGA
<b><i>CAV1</i></b>	CAV1-F	GTACGACGCGCACACCAA
	CAV1-R	TCCCTTCTGGTTCTGCAATCA
<b><i>CAV2</i></b>	CAV2-F	GATCCCCACCGGCTCAAC
	CAV2-R	CACCGGCTCTGCGATCA
<b><i>CCNA2</i></b>	CCNA2-F	GCAGCAGAGGCCGAAGAC
	CCNA2-R	CCAAGGAGGAACGGTGACA
<b><i>CD44</i></b>	CD44-F	ACCCTCCCCTCATTCACCAT
	CD44-R	GTTGTACTACTAGGAGTTGCCTGGATT
<b><i>CTGF</i></b>	CTGF-F	ACAAGGGCCTCTTCTGTGACTT
	CTGF-R	GGTACACCGTACCACCGAAGAT
<b><i>EDN1</i></b>	EDN1-F	ACTTCTGCCACCTGGACATCA
	EDN1-R	CTCCAAGGCTCTCTTGGACCTA
<b><i>EGF</i></b>	EGF-F	TGCCAGCTGCACAAATACAGA
	EGF-R	TCTTACGGAATAGTGGTGGTCATC
<b><i>FGF9</i></b>	FGF9-F	TATCCAGGGAACCAGGAAAGAC
	FGF9-R	CTGACCAGGCCCACTGCTATAC
<b><i>FGF17</i></b>	FGF17-F	CCGAGGACGGCAACAAGT
	FGF17-R	ACTTCTCACTCTCAGCCCCTTTG
<b><i>ICAM1</i></b>	ICAM1-F	CGGCTGACGTGTGCAGTAAT
	ICAM1-R	CTTCTGAGACCTCTGGCTTCGT
<b><i>IL6</i></b>	IL6-F	CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA
	IL6-R	GAGCAGCCCCAGGGAGAA
<b><i>IL8</i></b>	IL8-F	TGGCAGCCTTCCTGATTTCT
	IL8-R	GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG
<b><i>IL15</i></b>	IL15-F	CATCCAGTGCTACTTGTGTTTACTTCT
	IL15-R	CCAGTTGGCTTCTGTTTTAGGAA
<b><i>INTA10</i></b>	INTA10-F	CGAAGACTGGTAGGGAAACTGTTTA
	INTA10-R	GCCGACTGAGGTTCTTTGCT
<b><i>ITGB1</i></b>	ITGB1-F	GAAAACAGCGCATATCTGGAAATT
	ITGB1-R	CAGCCAATCAGTGATCCACAA
<b><i>KRT8</i></b>	KRT8-F	GATCTCTGAGATGAACCGGAACA
	KRT8-R	GCTCGGCATCTGCAATGG

<b>OPN</b>	OPN-F	CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGGA
	OPN-R	CGTCTGTAGCATCAGGGTACTG
<b>PRKAA</b>	PRKAA-F	AATCCTTCTGTGATTAGCCTTTTG
	PRKAA-R	GATCCTCAGGAAAGAGATATTTTGGA
<b>PRKCA</b>	PRKCA-F	TGGGTCACTGCTCTATGGACTTATC
	PRKCA-R	CGCCCCCTCTTCTCAGTGT
<b>SOX5</b>	SOX5-F	GGTGGCTGCTGTGACAAAGGGA
	SOX5-R	ACGGAGAGGCTGGTCGCTTG
<b>SOX6</b>	SOX6-F	GCAGTGATCAACATGTGGCCT
	SOX6-R	CGCTGTCCCAGTCAGCATCT
<b>SOX9</b>	SOX9-F	TTGAGACCTTCGACGTCAATGAG
	SOX9-R	TCTGGCCACGAGTGGCC
<b>TGFB1</b>	TGFB1-F	CACCCGCGTGCTAATGGT
	TGFB1-R	AGAGCAACACGGGTTCAGGTA
<b>TNFA</b>	TNFA-F	TGATCGGTCCCAACAAGGA
	TNFA-R	TGGGCTACGGGCTTGTC
<b>TUBB6</b>	TUBB6-F	GTGCGGTCTGGGCCTTTT
	TUBB6-R	CTCCGTGTAGTGCCCTTTCG
<b>VCAM1</b>	VCAM1-F	CATGGAATTCGAACCCAAACA
	VCAM1-R	GGCTGACCAAGACGGTTGTATC
<b>VEGFA</b>	VEGFA-F	GCGCTGATAGACATCCATGAAC
	VEGFA-R	CTACCTCCACCATGCCAAGTG
<b>VEGFD</b>	VEGFD-F	TGCAGGAGGAAAATCCACTTG
	VEGFD-R	CTCGCAACGATCTTCGTCAA
<b>VIL2</b>	VIL2-F	GAAGTGCACAAGTCTGGGTACCT
	VIL2-R	CTCCCACTGGTCCCTGGTAAG
<b>VIM</b>	VIM-F	TTCAGAGAGAGGAAGCCGAAAAC
	VIM-R	AGATTCCACTTTGCGTTCAAGGT

### 2.1.7 ELISA Kits

IL-6	R&D Systems Inc.
IL-8	R&D Systems Inc.
EGF	R&D Systems Inc.
VEGFD	R&D Systems Inc.
FGF17	USCN Life Science Inc.

### **2.1.8 Chondrozyten**

Für jeden Versuchsansatz wurden die Knorpelzellen (Chondrozyten) sechs verschiedener Spender verwendet (Provitro, Berlin). Der Ursprung der Zellen als auch das Alter, das Geschlecht und die Krankengeschichte der Spender unterlagen der Geheimhaltung der Firma und sind mir nicht bekannt. Die verwendeten Zellen wurden direkt in den Kulturflaschen ausgesät und für die Experimentansätze verwendet oder als 1g-Kontrollproben kultiviert, nachdem sie Subkonfluenz in niedrigen Passagen (P2 und P3) erreicht hatten. Dies war wichtig, da Chondrozyten nach mehrmaligem Passagieren ihren Phänotyp zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen ändern und überwiegend Typ I-Kollagen produzieren (Wu et al. 2013). Dieser Vorgang wird als Dedifferenzierung bezeichnet und ist durch den Verlust der Fähigkeit zur Kollagen-II-Synthese charakterisiert (Matlovits et al. 2003, Wu et al. 2013).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkulturtechnik**

Die für die Experimente benötigten Zellen wurden im Institut für Biomedizin der Universität Aarhus in den Laboratorien von Frau Professor Daniela Grimm gezüchtet.

#### **2.2.1.1 Aussaat der Zellen in Kulturflaschen**

Hierzu wurden in Stickstoff eingefrorene Zellen aufgetaut und je nach Versuch entweder in DMEM/F-12 Medium oder Chondrozyten-Wachstumsmedium mit und ohne Wachstumsfaktoren überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min lang bei 2.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde dekantiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in Medium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte bei Standardzellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt. Waren die Zellen subkonfluent, mussten sie subkultiviert werden.

#### **2.2.1.2 Subkultivieren der Zellen**

Die Chondrozyten können bis zu maximal vier Mal passagiert werden, da die Zellen während der Subkultivierung ihren Phänotyp ändern und zu Fibroblasten dedifferenzieren können (Marlovits et al. 2003(a)). Deswegen war zu beachten, dass nach jeder Subkultivierung die Zellen für weitere Versuche wieder eingefroren werden müssen (Kap. 2.2.1.3).

Dafür wurde das Medium vollständig abgenommen, die Zellen mit DPBS gespült und anschließend je nach Kulturflaschengröße mit 1, 2 oder 3 ml Trypsin für etwa 15 min bei RT - oder bei sehr stark adhären Zellen im Brutschrank bei 37 °C - inkubiert. Nach 5-10 min wurde der Ablösungsgrad beurteilt, und nach vollständiger Ablösung wurde die Reaktion mit Kultivierungsmedium gestoppt. Dafür wurde die Zellsuspension mit Medium versetzt und zur weiteren Kultivierung nach Zentrifugation (5 min, 1.500 rpm) und Resuspension des Zellpellets mit frischem Medium in weitere Kulturflaschen (T175 oder T75) mit vorgelegtem Kultivierungsmedium überführt.

#### **2.2.1.3 Herstellung von Zell-Kryokulturen**

Die Zellen wurden passagiert und die Zellsuspension 10 min lang bei 2.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium (DMEM/F-12 oder CGM) mit 20 % FCS und 10 % DMSO resuspendiert. Je 1,5 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden 2 h lang bei -20 °C, über Nacht bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

## **2.2.2 Gewinnung vom Zellmaterial**

### **2.2.2.1 RPM- und Klinostat-Versuche**

Nach 30 min, 2, 4, 16, 24 h, 7, 14, 21, und 28 d auf der RPM, auf dem FRC oder unter normalen Gravitationsbedingungen (1g) wurden jeweils die entsprechenden Kulturen geerntet. Dazu wurde das Medium aus den Kulturfalschen abpipettiert bzw. dekantiert, zentrifugiert (6.000 rpm) und die Zellen (Sphäroide) sowie der getrennte Überstand zur weiteren Untersuchung aufgehoben. Die adhären Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflaschen bzw. Flasketten abgelöst, in DPBS resuspendiert und zentrifugiert (6.000 rpm). So wurden einerseits Einzelzellen, andererseits Sphäroide gewonnen, die für quantitative real-time PCR (qPCR) und Western Blot-Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

Die Sphäroide für immunhistochemische Färbungen wurden aus dem Medium direkt isoliert, in DPBS gewaschen und in 4 % PFA fixiert (Aleshcheva et al. 2013).

### **2.2.2.2 RWV-Versuche**

Nach 7, 14, 21 und 28 d wurden die Sphäroide aus der RWV geerntet. Dazu wurden sie vorsichtig mit der Kolbenhubpipette gefangen, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und mit DPBS gewaschen. Für weitere qPCR- und Western Blot-Analysen wurden die Sphäroide in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für immunhistochemische Färbungen wurden sie in 4 % PFA fixiert.

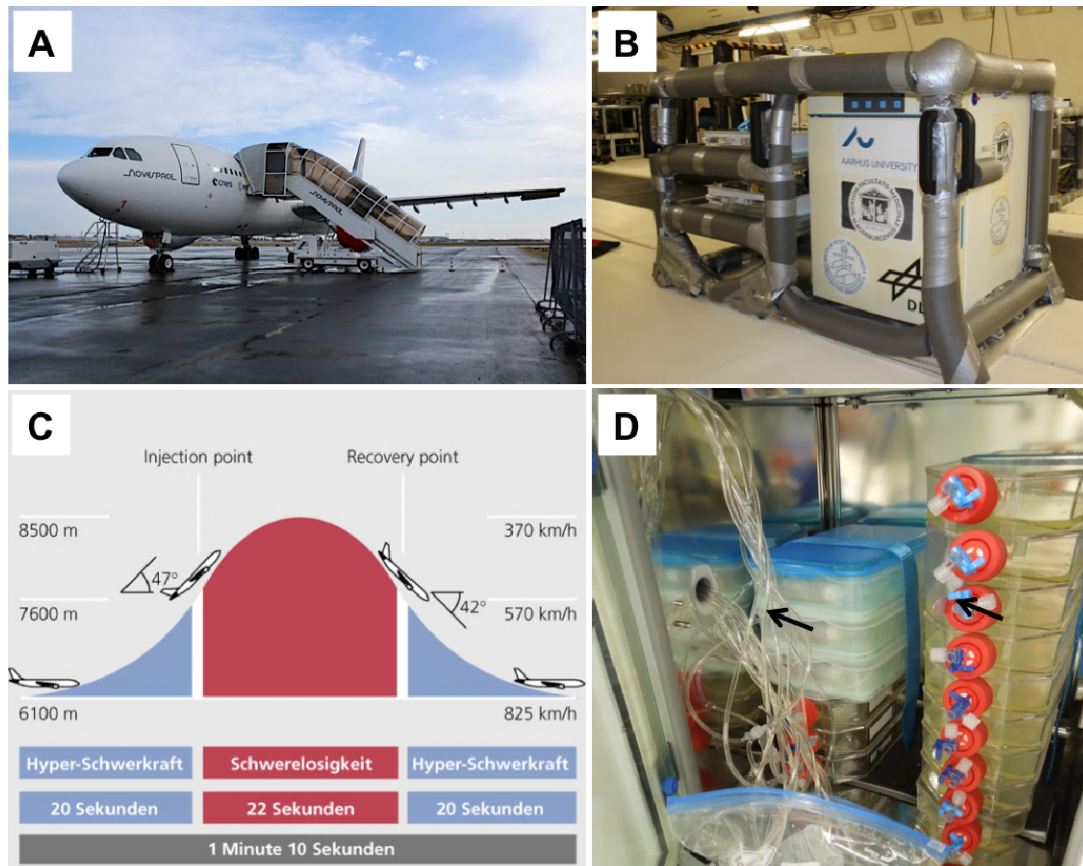
## **2.2.3 DLR Parabelflug-Experimente**

Die Parabelflug-Versuche fanden an Bord des Airbus A300 ZERO-G (Abb. 5A), der von der Firma Novespace betrieben wird, und von dem Flughafen Bordeaux-Mérignac (Frankreich) startet. Auf dem Flughafen befindet sich auch das Labor für die Experimentvor- und nachbereitung.

Der übliche Parabelflug beinhaltet 31 Parabeln mit jeweils 22 s Mikrogravitation (Abb. 5C) und dauert insgesamt bis zu 4 h. Jede Mikrogravitationsphase wird von 2 Hypergravitationsphasen (1,8g) begleitet.

Die Chondrozyten in T175 Zellkulturflaschen (Abb. 5D) oder auf den in einer Plastikbox aufbewahrten gekammerten Supercell Kulturkammerobjektträgern (Abb. 5D) wurden in einem Inkubator, der in ein spezielles Parabelflugrack eingebaut war (Abb. 5B), während des Fluges bei 37 °C inkubiert und nach der ersten (1P) und der letzten (31P) Parabel fixiert.





**Abbildung 5: Parabelflug-Experiment**

Parabelflugzeug (A) der Firma NOVESPACE mit dem Flugprofil (DLR, Köln) (C) während der 24. DLR Parabelflug-kampagne in Bordeaux. Der Flugrack (B) bestehend aus dem Inkubator mit Zellkulturflaschen und in einer Plastikbox aufbewahrten gekammerten Supercell Kulturkammerobjektträgern (D) (DLR, Köln).

Diese Abbildung wurde teilweise in Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

### 2.2.3.1 Ablauf eines Parabelfluges

Das Flugzeug flog horizontal mit Höchstgeschwindigkeit und ging dann mit einem Bahnneigungswinkel von  $47^\circ$  in einen Steigflug über (Abb. 5C). Während dieser Zeit (20 s) herrschten an Bord ca.  $1,8g$ , die auf die Experimente und Passagiere wirkten. Danach wurden die Triebwerke gedrosselt, und es folgte die eigentliche Schwerelosigkeitsphase von 22 s Dauer (Abb. 5C). Beim anschließenden Abfangen des Flugzeugs zurück in den Horizontalflug wirkten erneut 20 s lang  $1,5g$  –  $1,8g$  auf Passagiere und Experimente ein (Abb. 5C). Wegen der möglichen Turbulenzen und manueller Flugzeugführung betrug die Schwerelosigkeitsqualität ca.  $10^{-2}g$ .

### 2.2.3.2 Zellfixierung

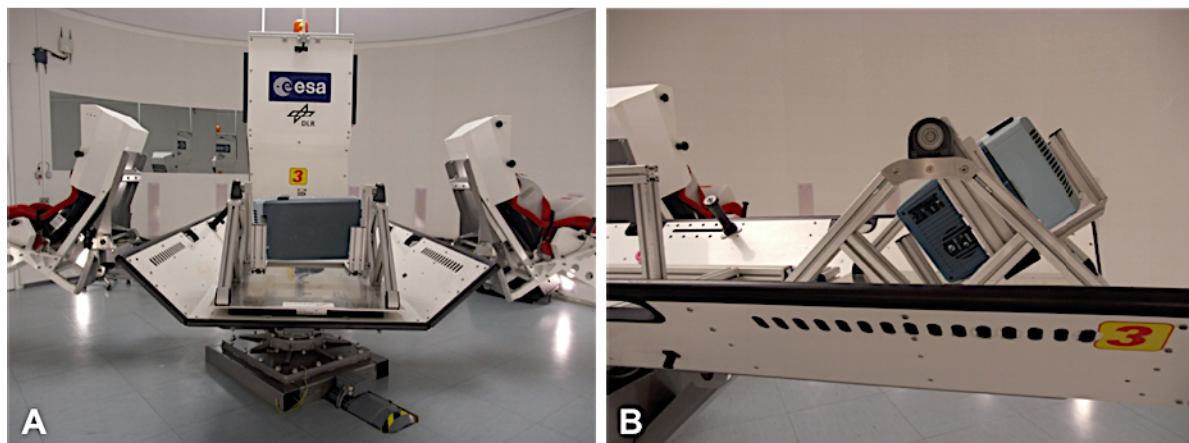
Die Zellen in den Flasketten für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden durch Zugabe von 20 % Paraformaldehyd fixiert, sodass dessen Endkonzentration 3 % betrug. Zellen in T25- oder T175-Kulturflaschen wurden nach der ersten und der 31. Parabel mit RNAlater im Verhältnis 4:1 fixiert. Für jede Versuchsreihe wurden  $n = 6$  T175 Kulturflaschen für qPCR und  $n = 5$  Flasketten für

histologische Untersuchungen gesammelt. Alle Kulturflaschen und Flasketten wurden direkt nach dem Flug bearbeitet. Die Zellen in *RNAlater* wurden abgekratzt und in 50 ml Röhrchen gesammelt. Zu der Zellsuspension in *RNAlater* wurde zur Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit DPBS im Verhältnis 1:1 zugegeben. Das Gemisch wurde 10 min lang bei 4.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -80 °C für die geplante qPCR oder Western Blots Untersuchungen aufbewahrt. Die fixierten Chondrozyten auf den Supercell Kulturkammerobjektträgern wurden mit DPBS gewaschen und mit frischem PFA (3 %) versetzt.

Die entsprechenden Bodenkontrollen wurden in der gleichen Anzahl während des Parabellfluges im Labor fixiert und gesammelt.

#### 2.2.4 Hypergravitationsexperimente

Hypergravitation wurde auf der Kurz-Arm Humanzentrifuge (Short-Arm Human Centrifuge (SAHC), DLR, Köln) erzeugt (Abb. 6A), auf der zwei tragbare Inkubatoren platziert wurden (Abb. 6B). Die SAHC wurde rechnergesteuert betrieben und die Zellen wurden einer Hypergravitationsphase von 1,8g für ca. 2 h ausgesetzt, was einer Zeitperiode von etwa 31 Parabeln entspricht. Die 1g-Kontrollproben wurden parallel im stationären Inkubator im Labor kultiviert.



**Abbildung 6: Hypergravitationsexperimente auf der SAHC**

**A.** Kurz-Arm Humanzentrifuge (Short-Arm Human Centrifuge (SAHC), DLR, Köln); **B.** Tragbarer Inkubator auf der SAHC. Diese Abbildung wurde in Wehland und Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

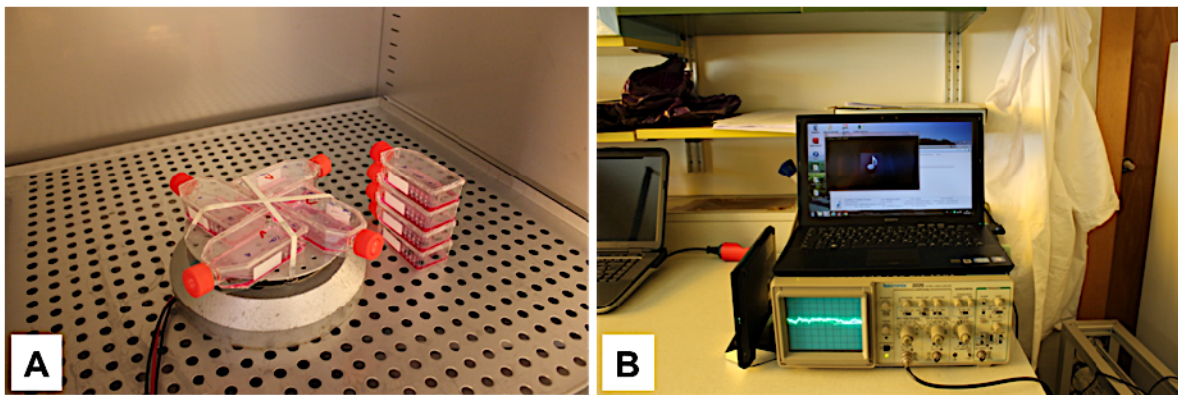
Nach dem Lauf wurde das Medium aus den Kulturflaschen dekantiert und die Zellen wurden sofort mit 10 ml *RNAlater* fixiert, abgekratzt und in 50 ml Röhrchen gesammelt. Zu der Zellsuspension in *RNAlater* wurde DPBS im Verhältnis 1:1 zugegeben. Das Gemisch wurde 10 min lang bei 4.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -80 °C für die geplante qPCR aufbewahrt.

#### 2.2.5 Vibrationsexperimente

Während eines Parabellfluges wurden die Zellen nicht nur Hypergravitationsphasen, sondern auch

Vibrationen unterschiedlicher Intensität ausgesetzt. Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der Vibrationseinfluss auf humane Chondrozyten untersucht.

Vier T25-Kulturflaschen mit bis zu 90 % konfluenten Monolayer-Kulturen wurden auf der Vibraplex-Plattform (DLR, Köln) fixiert und in den Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> platziert (Abb. 7A). Es wurden Frequenzen von 0,2 Hz bis 14 Hz für 2 h programmiert (Abb. 7B), die den 3 Phasen des Parabelfluges entsprechen: “pull up” (1,8g), freier Fall (Schwereelosigkeit,  $\mu$ g), und “pull out” (1,8g) (Schmidt 2004). Die 1g-Kontrollen wurden im gleichen Inkubator kultiviert (Abb. 6A). Anschließend wurde das Medium aus allen Kulturflaschen dekantiert, und die Zellen in 5 ml kaltem DPBS mit dem Zellschaber geerntet. Nach Zentrifugation bei 4.000 rpm wurde das Zellmaterial bei -80 °C für die geplante qPCR aufbewahrt (Aleshcheva et al. 2015).



**Abbildung 7: Vibrationsexperimente auf der Vibraplex (DLR, Köln)**

**A.** Vibraplex mit 4 T25 Kulturflaschen und 4 1g-Kontrollen im Inkubator; **B.** Oszillograph zur Einstellung der Vibrationsintensität

## 2.2.6 Mikroskopie

Für die morphologische Untersuchung ungefärbter bzw. mit Alcian Blan, Neutralrot oder Hämatoxylin-Eosin gefärbter Zellen und Sphäroide in Kulturflaschen, Flasketten oder auf Objektträgern wurde ein Phasenkontrastmikroskop verwendet. Die Untersuchung fluoreszenzgefärbter Zellen (Vimentin, beta-Tubulin, Zytokeratin, Integrin-beta<sub>1</sub>, F-Aktin) fand mittels eines konfokalen Laserscan-Mikroskops statt.

## 2.2.7 Western Blot Analyse

Die Western Blot Technik verwendet ähnlich wie die Immunhistochemie monoklonale Antikörper, die speziell an das gesuchte Protein binden. Die Proteine werden hierzu zunächst mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei man sich deren Größe zur Auftrennung zunutze macht. Anschließend werden die so separierten Proteine auf eine Membran übertragen, mit Antikörpern inkubiert und anschließend die Antikörperfärbung entwickelt.

### 2.2.7.1 Zelllysis

Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Zellpellets und bei -80 °C gelagerten Proben wurden in

Lysispuffer aufgenommen und unter mehrmaligen Auf- und Abpipettieren 30 min auf Eis homogenisiert und lysiert. Dadurch werden die Zellmembranen aufgeschlossen. Die dabei frei werdenden Proteasen, die den Nachweis der Proteine durch deren Destruktion qualitativ und quantitativ beeinträchtigen, wurden durch die Zugabe von 10 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 5 µl Pepstatin A (PEP) je Milliliter Lysispuffer inhibiert. Die Homogenate wurden für 30 min bei 4 °C mit 10.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in Eppendorf-Röhrchen transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Unlösliche Rückstände wurden verworfen.

#### **2.2.7.2 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Proben erfolgte in der Dreifachbestimmung auf einer Microtiterplatte. Je 20 µl (ggf. 1:10-1:100 verdünnt) des Proteinextraktes wurden mit 100 µl 15:1-Mischung aus Reagenz 1 und Reagenz 2 der Röti®-Quant universal versetzt. Zum Vergleich wurde eine BSA-Standardreihe (2 µg/µl, 1 µg/µl, 0,5 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,125 µg/µl, 0,063 µg/µl) angelegt. 20 µl jeder Probe aus der Standardreihe wurden wie die eigentliche Probe mit 15:1-Mischung aus Reagenz 1 und Reagenz 2 der Röti®-Quant universal versetzt. Die Microtiterplatte wurde 30 min lang bei 60 °C inkubiert. Die resultierenden Extinktionen wurden im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

#### **2.2.7.3 Reduktion der Proben**

Alle Proben wurden mit Lysepuffer auf 100 µl der gleichen Konzentration von 3 µg/µl gebracht. Außerdem wurden sie mit 50 µl Probenpuffer und 2,5 µl 2-Mercaptoethanol versetzt und für 15 min bei 95 °C erhitzt. Nachdem die Proben auf RT abgekühlt waren, konnte sie aufs Gel geladen werden.

#### **2.2.7.4 Auftrennung der Proteine**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf dem 4-15 % fertigen Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel (10 Wells) oder auf dem Criterion™ TGX™ Precast Gel (26 Wells). Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebracht und diese mit Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt. In jedes der Wells wurden bis zu 30 µl der jeweiligen reduzierten Probe pipettiert und daraufhin die Proteine 15 min bei 60 Volt und 60 min bei 150 Volt aufgetrennt.

#### **2.2.7.5 Western Blot Analyse**

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit den darin befindlichen aufgetrennten Proteinen vorsichtig aus der Plastikverpackung herausgenommen, auf der UV-Schublade des ChemiDoc MP Systems plaziert und nach Protokoll gefärbt. Nach der Färbung wurde das Gel zwischen den Komponenten des Trans-Blot® Turbo™ Midi oder Mini PVDF oder Nitrozellulose Transfer Packs aufgenommen und in das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System eingespannt. Nach dem Wählen des

richtigen Programms (abhängig von der Gelgröße und Anzahl der Gele) begann der eigentliche Vorgang des Western Blots, d.h. des Transfers der Proteine vom Gel auf die Membran, der maximal 7 min betrug. Danach wurde die Membran im Block-Reagenz (1 oder 2, Kap. 2.1.5) für mindestens 30 min bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde die Membran bei RT über Nacht in eine Lösung aus dem Block-Reagenz und Primär-Antikörper gelegt und am nächsten Tag mit TBS-T drei Mal gewaschen. Daraufhin erfolgte eine weitere 1 h lange Inkubation bei RT mit dem verdünnten HRP-Zweitantikörper. Zuletzt wurde die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen und entwickelt.

#### **2.2.7.6 Membranentwicklung**

Die Entwicklung der Membran erfolgte mit dem ChemiDoc MP System. Dazu wurde die Membran zuerst mit Clarity Western ECL Substraten (Verhältnis 1:1) 5 min lang inkubiert und anschließend die chemilumineszenten Bandenmuster mit einer empfindlichen digitalen Kamera des ChemiDoc MP Systems aufgenommen. Die entstandenen Bilder wurden gespeichert und densitometrisch quantifiziert (Image J Programm).

### **2.2.8 qPCR Untersuchungen**

#### **2.2.8.1 RNA Isolation**

Die Zellen wurden nach jedem Versuchslauf mit einem Zellschaber abgekratzt, das Zellmaterial in einem 50 ml Röhrchen aufgenommen und zentrifugiert (4.000 rpm, 10 min, 4 °C). Die RNA Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit oder AllPrep RNA/Protein Kit.

Das Prinzip der RNA-Isolierung mit dem Qiagen-Kit basiert auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Die Probe wird unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert und homogenisiert. Der Lysispuffer enthält Guanidium Isothiocyanat und  $\beta$ -Mercaptoethanol, um RNasen zu inaktivieren. Durch Zugabe von Ethanol werden optimale Bedingungen geschaffen, um die RNA an eine Silicagel-Membran zu binden. In mehreren Waschschritten werden Kontaminationen entfernt und die RNA nachfolgend mit DEPC-Wasser von der Membran eluiert.

Für die RNA-Isolation wurde das Zellpellet in Lysispuffer aufgenommen (350  $\mu$ l für bis zu  $10^7$  Zellen oder 600  $\mu$ l für  $> 10^7$  Zellen) und durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Das Gemisch wurde zur Homogenisierung auf eine QIAshredder-Säule gegeben und diese 1 min lang bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wurde mit 70 % Ethanol im Verhältnis 1:1 versetzt und gründlich durch Auf- und Abpipettieren bis zur Homogenität gemischt. Jede Probe wurde sukzessive auf RNeasy-Säulen geladen und 15 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden 1 min lang mit je 700  $\mu$ l Puffer RW1 gewaschen, anschließend in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und zweimal mit 500  $\mu$ l Waschpuffer RPE 30 s gewaschen. Der 2. Zentrifugationsschritt betrug 1 min statt 30 s, um die Membran zu trocknen. Zur Elution wurden die Säulen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße platziert



und mit 20 µl DEPC-Wasser versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden die Proben 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.

#### **2.2.8.2 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Reinheit und die Konzentration der isolierten RNA wurden photometrisch bestimmt. Hierbei wurden die Extinktionen bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die optische Dichte einer Nukleinsäurelösung bei 260 nm ist ein Maß für die Konzentration an Nukleotiden. Die optische Dichte einer Nukleinsäurelösung bei 280 nm gibt Aufschluss über die Verunreinigung mit Proteinen. Für eine akzeptable Reinheit sollte die isolierte RNA ein A260/280-Verhältnis von 1,7 oder höher aufweisen. Darüber hinaus sollten die absoluten Extinktionswerte bei 260 nm nicht über 0,8 liegen, da sonst die lineare Abhängigkeit zur Nukleinsäurekonzentration nicht mehr gegeben ist.

#### **2.2.8.3 cDNA-Synthese**

cDNA für die qPCR wurde mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit synthetisiert. Dafür wurden 1 µg der Gesamt-RNA jeder Probe und 1 µl des Random Hexamer Primers verwendet. Das Gemisch wurde mit RNA-freiem Wasser auf 11 µl aufgefüllt und mit 4 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix und 2 µl RevertAid M-MuLV RT versetzt. Nach dem Mischen wurde das Gemisch auf eine Microtiterplatte pipettiert, die anschließend 5 min bei 25 °C und 60 min bei 42 °C inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch eine 5-minütige Inkubation bei 70 °C beendet.

#### **2.2.8.4 Quantitative real-time PCR**

Im Unterschied zu den herkömmlichen PCR-Methoden zur Bestimmung der Expression eines Zielgens, die im Wesentlichen Endpunktanalysen sind und daher starken Limitationen unterliegen, erlaubt die quantitative real-time PCR die direkte Beobachtung der Akkumulation des Reaktionsproduktes schon während des PCR-Laufs und damit eine präzisere Quantifikation des zu amplifizierenden Templates. Es gibt verschiedene Ansätze zur Detektion der gebildeten DNA-Doppelstränge wie z.B. die TaqMan-Chemie, Molecular Beacons, Light Cycler Sonden oder Scorpion Primer. In dieser Arbeit wurde SYBRGreen benutzt. SYBRGreen ist ein Baseninterkalatorfarbstoff, der nach Einlagerung in eine DNA Doppelhelix fluoresziert und dem PCR-Reaktionsansatz beigemischt wird. Bei ansteigenden Mengen des PCR-Produktes im Laufe der Reaktion steigt gleichermassen auch die SYBRGreen-Fluoreszenzintensität, welche jeweils am Ende der Elongationsphase der einzelnen Zyklen gemessen wird. Aufgrund der unspezifischen Anlagerung des Farbstoffes in jeden gebildeten DNA Doppelstrang sind bei dieser Detektionsmethode falsch positive Signale bei Misprimings nicht ausgeschlossen. Daher muss am Ende eines jeden Assays noch eine Schmelzpunktanalyse angeschlossen werden, die es ermöglicht, die Spezifität der PCR-Reaktion zu beurteilen.

Alle Untersuchungen wurden auf einem 7500 fast real-time PCR System durchgeführt. Zur eigentlichen Messung wurde ein Master Mix (bestehend aus MMS Puffer, Primer-F, Primer-R, Sonde und destilliertem Wasser) hergestellt. 72 µl des Master Mixes wurden mit 3 µl cDNA vermischt und gevortext. Auf einer Mikrotiterplatte wurde nun ein Dreifachansatz durchgeführt, wobei je Well 23 µl Mischung eingebracht wurden. Nach Versiegelung der Platte mit einer transparenten selbstklebenden Folie (Optical Adhesive Cover) wurde die Platte in das Gerät eingesetzt. Die PCR Bedingungen waren wie folgt: 20 s bei 95 °C, 40 Zyklen von 3 s bei 95 °C, und 30 s bei 60 °C, gefolgt vom Schritt der Schmelzkurvenanalyse (Temperaturgradient von 60 bis 95 °C mit +0.3°C/Zyklus). Wenn alle Amplifikationsprodukte (Amplikons) eine einheitliche  $T_m$  ähnlich der durch die Primer Express® Software vorhergesagten zeigten, wurde die PCR-Reaktion als spezifisch charakterisiert. Die komparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) Methode wurde für die relative Quantifizierung der einzelnen Proben genutzt. 18S rRNA diente als Housekeeping-Gen, um die Expressionsdaten zu normalisieren.

### **2.2.9 ELISA**

Die Methode des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) beruht auf einer Antigen-Antikörper Reaktion und einer spezifischen enzymatischen Farbreaktion. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren des indirekten Nachweises eines Proteins. In dieser Arbeit wurde diese Methode zur Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen herangezogen.

Während der Arbeit wurden ELISAs von IL-6, IL-8, EGF, VEGFD und FGF17 im Zellüberstand aus den Vibrations- und Hypergravitationsversuchen durchgeführt. Die verwendeten ELISAs wurden als Fertigsysteme erworben und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Es wurde eine definierte Standardreihe des zu detektierenden Antigens nach dem mitgelieferten Protokoll vorbereitet. Zu jedem Well der Platte wurden 100 µl von Assay Diluent RD1W und 100 µl von dem Standard, der Probe oder der Kontrolle zugegeben. Die Platte wurde mit Klebestreifen zugedeckt und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde jedes Well viermal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen und mit 200 µl Konjugat für 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte viermal gewaschen, um überschüssiges Konjugat zu entfernen. Anschließend wurden zu jedem Well 200 µl der Substratlösung ( $H_2O_2$ /Tetramethylbenzidin-Gemisch) zugegeben. Die Platte wurde für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dabei bildete sich ein blauer Farbstoff. Nach der Zugabe von 50 µl Stopplösung (2N Schwefelsäure) wurde ein Farbumschlag von blau nach gelb detektiert. Mit einem Spektrophotometer wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Anhand der mitgeführten Standardreihe konnte das in der Probe enthaltene Antigen genauestens quantifiziert werden. Die Auswertung erfolgte über eine 4-Parameter logistische (4PL) Regression der Standardwerte mit anschließender Berechnung der unbekannten Proben.

### **2.2.10 Microarray Genuntersuchungen**

Die Microarray Untersuchungen wurden von Professor Norbert Hübner, Dr. Katrin Saar und Dr. Herbert Schulz im Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin-Buch durchgeführt. Es wurde die RNA sowohl aus den Zellen der Vibrations- und Hypergravitationsversuche als auch aus den Zellen, die während des Parabelfluges nach der ersten und der 31. Parabel fixiert wurden, extrahiert. Die genspezifische Probenbildung erfolgte auf den 6-Kammer Illumina Beadchip (Illumina HumanWG-6\_V2\_0\_R3). Auf dem Chip wurde die RNA linear amplifiziert, Biotin gelabelt und dann mit den probebindenden Beads hybridisiert. Die resultierenden Profile wurden ohne Hintergrundkorrektur mit BeadStudio Gene Expression Module v3.3.7 quantil normiert.

Nach dem Ausschluss von niedrigen und nicht-exprimierten Genen wurden die signifikanten Expressionsunterschiede mit ANOVA bestimmt. Die Unterscheidung von Expressionsprofilen wurde durch das K-Mean clustering durchgeführt. K wurde entsprechend dem lokalen Minimum vom Davies Bouldin K Schätzungsverfahren gewählt (Davies et al. 1979). Die Qualität des Arrays und des Expressionsprofils wurde durch die Principal Component Analysis (PCA) mit der Partek Genomic Suite (Version 6.6) überprüft. Funktionelle Aspekte von unterschiedlich exprimierten Proben wurden mit der g:Profiler Software und den DAVID Bioinformatics Resources 6 analysiert (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

Physikalische und die funktionelle Interaktionen zwischen den Proteinen wurden mit der String Plattform am niedrigen Konfidenzpunkt von 0,15 bestimmt (Snel et al. 2000).

### **2.2.11 Histologische Untersuchungen und Vitalitätsprüfung**

Nach jedem Versuch wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung der Zellen durchgeführt, um Gewebestruktur und Zellverteilung zu untersuchen. Die Vitalität und die Ablagerung von Glycosaminoglykanen in den 1g-Kontrollen und den RPM-exponierten Zellen wurden mit Neutralrot und Alcian Blau geprüft. Dafür wurden die Zellen 10 min lang mit 4 % PFA (in DPBS) fixiert, zweimal mit DPBS gewaschen und mit einem Tropfen der gemäß dem Protokoll des Herstellers verdünnten Färbelösung (verdünnt nach dem Protokoll des Herstellers) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit DPBS gewaschen und mit Entellan<sup>®</sup> für die weitere mikroskopische Untersuchung eingebettet.

### **2.2.12 Immunhistologische Untersuchungen**

Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert, am nächsten Tag in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 10 min lang: 100 %, 96 %, 70 % Ethanol) entparaffiniert und danach 5 min lang in DPBS rehydriert. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation mit Trypsin-EDTA bei 37 °C wurden die Schnitte mit Aqua dest. gewässert, in Citratpuffer (pH 6) überführt und 15 min lang bei 700 W in der Mikrowelle gekocht. Nach Abkühlung auf RT und dreimaligem



Waschen mit DPBS wurden die Präparate 1 h lang mit Ziegen Serum (1:10) beschichtet. Das Serum wurde abgekippt und der Primär-Antikörper 24 h lang auf die Schnitte gegeben. Einem dreimaligen Waschen mit DPBS folgte eine 20 min lange Inkubation mit einem Sekundär-Antikörper. Nach dem erneuten dreimaligen Waschen mit DPBS erfolgte eine 20 min lange Einwirkung von Peroxidase-Conjugate ExtrAvidin® (1:750). Das Konjugat wurde wiederum dreimal mit DPBS abgewaschen und die Färbelösung AEC-Chromogen 15 min lang auf den Präparaten belassen. Abschließend wurden die Schnitte einer Kernfärbung (Mayer's Hematoxylin Solution) für 1 min unterzogen, mit Glycerin-Gelatine eingebettet und mikroskopisch betrachtet.

### **2.2.13 F-Aktin Färbung mittels Rhodamin-Phalloidin**

Für die Darstellung des F-Aktins wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert. Nach dem Waschen mit DPBS wurden die Zellen für 5 min mit 0,1 % Triton X-100 in DPBS lysiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die 20-minütige Färbung der F-Aktin-Filamente erfolgte mittels 5 µg/ml Rhodamin-Phalloidin (gelöst in DPBS), welches laut Anleitung des Herstellers 1 % BSA enthält. Danach wurden die Zellen mehrmals mit DPBS gewaschen und die Zellkerne mit Hoechst 33342 für 5 min gefärbt.

Die Objektträger wurden mit VECTASHIELD® eingedeckt und die Zellen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (Zeiss) betrachtet und aufgenommen.

### **2.2.14 Indirekte Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz bedient sich monoklonaler Antikörper, um Proteine zu markieren und sichtbar zu machen. Hierzu wurden die Zellen bzw. Sphäroide auf gekammerte Supercell Kulturkammerobjektträger ausgesät und für 30 min inkubiert (Adhäsionszeit). Daraufhin wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Objektträger zwei Mal mit DPBS gewaschen und mit einem Gemisch aus Methanol und Ethanol (1:2) bei RT fixiert. Das Fixationsmittel wurde abgesaugt und die Objektträger zum Trocknen bei RT ausgelegt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und mit dem primären Antikörper (Vimentin,  $\beta$ -Tubulin, Zytokeratin, Integrin- $\beta_1$ ) über Nacht bei RT in der Färbekammer „feucht“ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut mit DPBS gewaschen und 2 h lang mit dem Sekundärantikörper (FITC-konjugiertes anti-Maus oder anti-Rabbit Immunglobulin) im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie erneut mit DPBS gewaschen und mit VECTASHIELD® eingedeckt. Die Zellmorphologie wurde mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (Zeiss) visualisiert.

### **2.2.15 Detektion der Apoptose**

Die Apoptose wurde mit Hilfe des FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kits detektiert. Beim FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit handelt es sich um ein nicht-isotopisches System für die Kennzeichnung von DNA Brüchen in apoptotischen Kernen von Paraffin-eingebetteten

Gewebeproben.

Zuerst wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 3 min lang: 100 %, 96 %, 70 % Ethanol) entparaffiniert und rehydriert. Danach wurden die Schnitte in TBS gewaschen und durch eine 20-minütige Inkubation mit 100 µl einer 20 µg/ml Proteinase-K-Lösung (1:100 in 10 mM Tris pH 8) bei RT permeabilisiert. Nach dem einmaligen Waschen mit TBS und Trocknen an der Luft wurden die endogenen Peroxidasen durch die 5-minütige Inkubation mit 100 µl 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verdünnt in Methanol) bei RT inaktiviert. Danach wurde die gesamte Probe mit TBS gewaschen, mit 100 µl 1X TdT Equilibration Puffer (1:5 in ddH<sub>2</sub>O) für 30 min beschichtet, nochmals gewaschen, mit 60 µl TdT Färbereaktionsmischung (57 µl TdT Labeling Reaction Mix + 3 µl TdT Enzym) beschichtet und in Färbekammer „feucht“ bei 37 °C für 1,5 h inkubiert.

Um die Reaktion zu beenden, wurden die Schnitte mit TBS gewaschen, mit 100 µl Stopplösung beschichtet, 5 min lang bei RT inkubiert und wieder einmal mit TBS gewaschen. Für den Apoptose-Nachweis wurden die Schnitte mit 100 µl Block-Reagenz bei RT für 10 min beschichtet. Danach wurden sie sofort mit 100 µl vom verdünnten Konjugat für weitere 30 min bei RT in der befeuchteten Kammer inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS wurde die Probe mit 100 µl DAB-Lösung bei RT für 10-15 min inkubiert und mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte durch die 3-minütige Inkubation mit 100 µl Methylen-Grün. Abschließend wurden die Proben 2-4 Mal in 100 % Ethanol und Xylol eingetaucht und mit Entellan eingebettet.

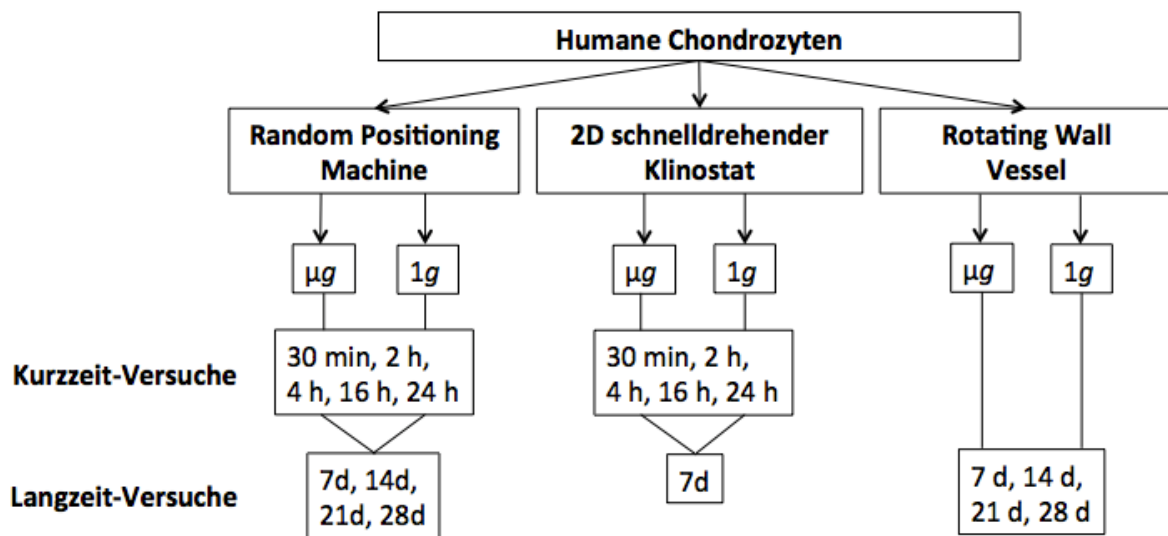
### **2.2.16 Statistik**

Für die statistische Auswertung wurde aus den Einzelwerten der jeweiligen Versuche für die entsprechende Versuchsgruppe der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet. Um die Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen wurde ein statistischer Lagetest verwendet. Da in den meisten Gruppen aufgrund der Probenmenge nur fünf oder sechs Replikate gemessen werden konnten, war die Grundgesamtheit (n) relativ gering. Daher war die Überprüfung der Einzelwerte auf das Vorliegen einer Normalverteilung nicht möglich und die Benutzung eines nicht-parametrischen Tests nötig.

In dieser Arbeit wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrisches Verfahren für die Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Stichproben angewendet. Bei einem Wert von  $P < 0,05$  wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Alle Analysen wurden mit der Software SPSS 12.0 durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war, die zellulären Veränderungen und die Sphäroidbildung von humanen Chondrozyten sechs verschiedener Spender unter den Bedingungen der simulierten Mikrogravitation ( $s\text{-}\mu\text{g}$ ) zu untersuchen. Dazu wurden drei verschiedene Bodenanlagen (RPM, FRC und RWV) genutzt, wobei die Knorpelbildung auf der RPM besonders detailliert untersucht wurde. Zunächst wurden Kurzzeitmikrogravitationsuntersuchungen der Zellen auf der RPM und im FRC (30 min, 2 h, 4 h, 16 h, und 24 h) durchgeführt (Abb. 8). Anschließend wurde während der Langzeitversuche auf der RPM und der RWV für 7, 14, 21, und 28 d die Sphäroidbildung im Detail analysiert (Abb. 8). Die  $s\text{-}\mu\text{g}$ -Gruppen wurden sowohl miteinander als auch mit den statischen  $1\text{g}$ -Kontrollen verglichen, die über dieselben Zeiträume unter normalen Gravitationsbedingungen ( $1\text{g}$ ) kultiviert wurden (Abb. 8).



**Abbildung 8: Die während der Doktorarbeit durchgeführten Versuche**

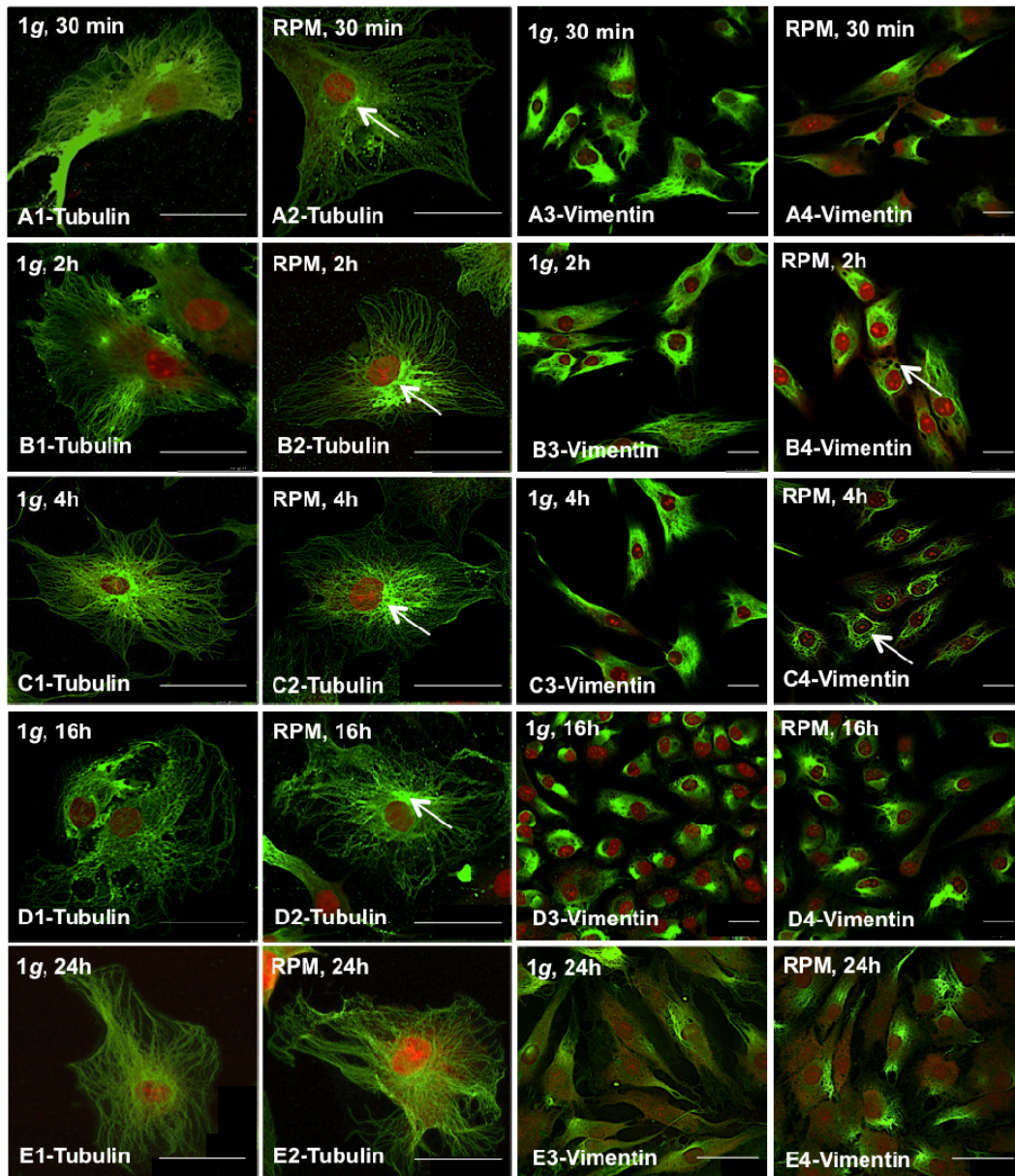
Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Versuche auf drei verschiedenen Bodenanlagen durchgeführt. Dabei sind die Kurzzeit-Versuche als auch Langzeit-Versuche unter simulierten Mikrogravitationsbedingungen ( $\mu\text{g}$ ) als auch unter normalen Gravitationsbedingungen ( $1\text{g}$ ) immer parallel gelaufen.

#### 3.1 Einfluss von simulierter Mikrogravitation auf Chondrozyten

Die unter simulierter Kurzzeitmikrogravitation auftretenden Zytoskelettveränderungen bei Chondrozyten wurden erstmalig während dieser Doktorarbeit untersucht. Es wurden zunächst morphologische Veränderungen des Zytoskeletts von Knorpelzellen nach einer RPM-Exposition von 30 min, 2, 4, 16 und 24 h und anschließend nach einer FRC-Exposition von 30 min, 2, 4, 16 und 24 h studiert. Die erzielten Ergebnisse wurden mit den entsprechenden Bodenkontrollen, die unter normalen Gravitationsbedingungen ( $1\text{g}$ ) kultiviert wurden, verglichen (Aleshcheva et al. 2013).

### 3.1.1 Einfluss von RPM-Exposition auf Chondrozyten

Bereits nach 30-minütiger RPM-Exposition zeigten sich Veränderungen des Zytoskeletts (Abb. 9A1-A4). Es fand sich eine perinukleäre Anhäufung von beta-Tubulin (Abb. 9A2). Vimentin wurde in der äußeren Zellmembran akkumuliert und in Form eines dichten Ringes um den Kern angelagert (Abb. 9A4), während in den Bodenkontrollen eine gleichmäßige Verteilung von Vimentin beobachtet wurde (Abb. 9A3).



**Abbildung 9: Immunofluoreszenz-Färbung von  $\beta$ -Tubulin und Vimentin in Chondrozyten nach der Kurzzeit-Exposition auf der RPM**

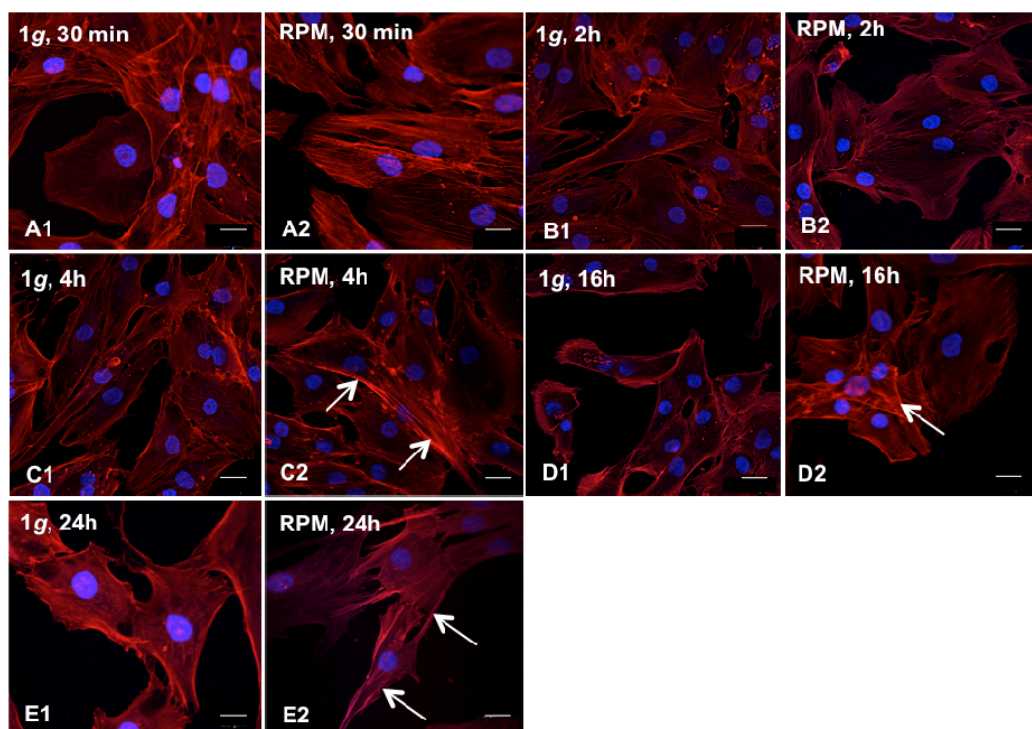
Immunfluoreszenz-Färbung von  $\beta$ -Tubulin und Vimentin der für 30 min (A1-A4), 2 h (B1-B4), 4 h (C1-C4), 16 h (D1-D4), 24 h (E1-E4) auf der RPM und entsprechend unter normalen Schwerkraftbedingungen (1g) kultivierten Chondrozyten. Die Nuklei sind mit Propidiumjodid gefärbt. Pfeile bei Tubulin deuten auf perinukleäre Anhäufung, Pfeile bei Vimentin deuten auf Löcher im Netzwerk. Maßstabsbalken – 10  $\mu$ m.

Die Daten wurden in Aleshcheva et al. 2013 publiziert.

Nach 2 h langen Inkubation auf der RPM wurden Löcher im Vimentin-Netz beobachtet (Abb. 9B4). Diese waren am besten nach 4 h nachzuweisen (Abb. 9C4). Zu diesem Zeitpunkt wurde auf der RPM die höchste Dichte von beta-Tubulin um den Kern beobachtet (Abb. 9C2). Nach 16-stündiger RPM-Exposition reduzierte sich die Dichte des beta-Tubulins um den Kern (Abb. 9D2). Die Immunfluoreszenzintensität von Vimentin war nach 16 h vergleichbar zu den Bodenkontrollen (Abb. 9D3, 9D4) (Aleshcheva et al. 2013).

Durch die Inkubation der Knorpelzellen auf der RPM für einen Zeitraum von 30 min bis 16 h wurde die zytoplasmatische Architektur der Chondrozyten verändert (Abb. 9). Allerdings konnten nach einer 24-stündigen RPM-Exposition keine morphologischen Veränderungen der Mikrotubuli (beta-Tubulin) oder Intermediärfilamente (Vimentin) mehr nachgewiesen werden (Abb. 9E1-E4) (Aleshcheva et al. 2013).

Die Form der Chondrozyten hatte sich ebenfalls verändert. Dieser Befund konnte durch die F-Aktin-Färbung bestätigt werden (Abb. 10). Nach 4-stündiger RPM-Exposition wurden kortikal lokalisierte Stressfasern beobachtet (Abb. 10C2). Mit steigender Kultivierungszeit auf der RPM fanden sich längere und dünnere Fasern (Abb. 10D2, 10E2) im Vergleich zu den 1g-Zellen (Aleshcheva et al. 2013).



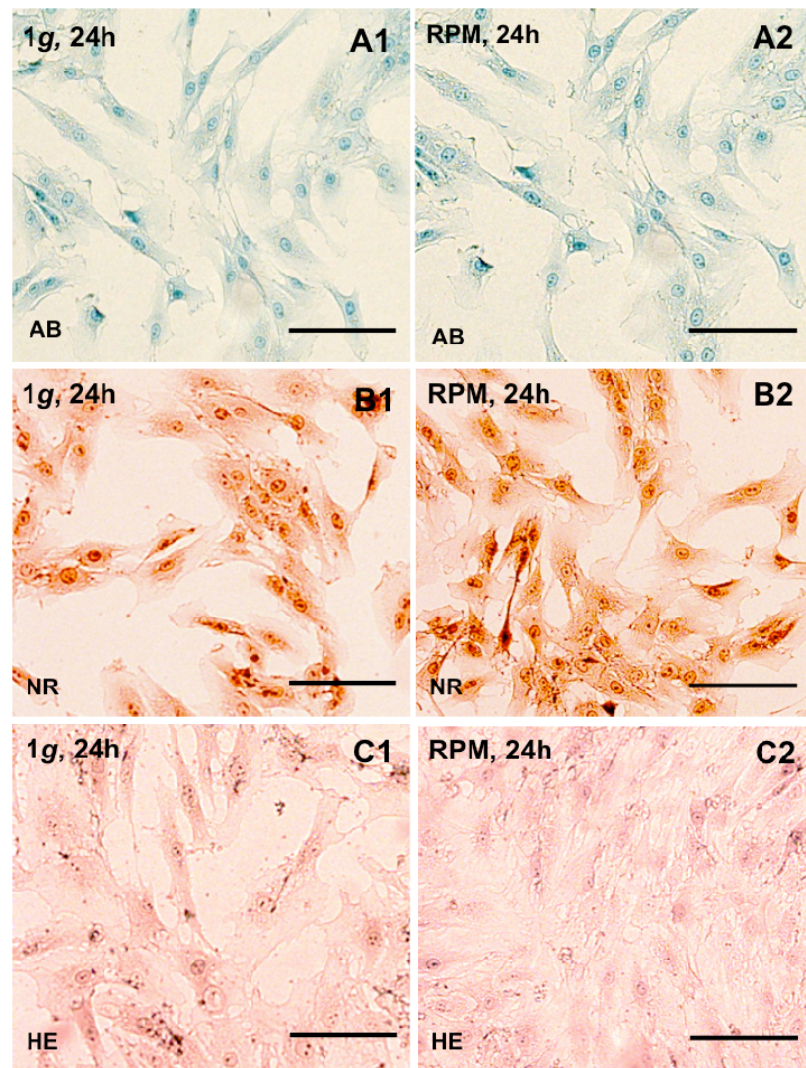
**Abbildung 10: Verteilung des F-Aktins in Chondrozyten nach der Kurzzeit-Exposition auf der RPM**

F-Aktin-Verteilung der für 30 min (A1-A2), 2 h (B1-B2), 4 h (C1-C2), 16 h (D1-D2), 24 h (E1-E2) auf der RPM und entsprechend unter normalen Schwerkraftbedingungen (1g) kultivierten Chondrozyten. Die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Pfeile deuten auf die aufgetretenen dünnen Stressfasern. Maßstabsbalken – 5  $\mu$ m.

Diese Ergebnisse wurden in Aleshcheva et al. 2013 publiziert.



Nach 24 h zeigten die Chondrozyten auf der RPM und auch in den Bodenkontrollen gleiche Vitalität, die mit Neutralrot und Hämatoxylin-Eosin Färbungen festgestellt wurde (Abb. 11B2, 11C2). Darüberhinaus wiesen die Zellen keine Unterschiede in der Zellmorphologie (Abb. 11C2) auf. Dagegen wurde die Produktion von sauren Polysacchariden wie Glycosaminoglycan nach 24 h Inkubation auf RPM reduziert, was durch die Alcian Blau Färbung festgestellt wurde: Die Intensität der Färbung war insbesondere um die Zellkerne reduziert (Abb. 11A2).



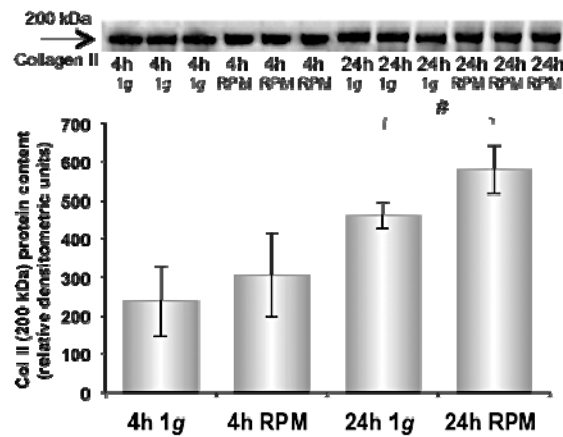
**Abbildung 11: Histologische Untersuchung der Chondrozyten nach der Kurzzeit-Exposition auf der RPM**

Histologische Untersuchung der auf der RPM und den unter normalen 1g-Bedingungen kultivierten Chondrozyten. Die Alcian Blau Färbung (AB; **A**) zeigt die Produktion von Proteoglykanen. Die Neutralrot Färbung (NR; **B**) stellt die Lebensfähigkeit (Zellviabilität) der Zellen dar. Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE; **C**) gibt einen Überblick über die Gewebestruktur und Zellverteilung. Maßstabsbalken – 30 µm.

Die Daten wurden in Aleshcheva et al. 2013 publiziert.

Die Western-Blot-Analyse von Kollagen Typ II zeigte im Vergleich zu 1g-Kontrollproben einen

erhöhten Proteingehalt dieses extrazellulären Matrixproteins in allen Chondrozyten-Proben nach 4 h und 24 h Exposition auf der RPM (Abb. 12). Die Menge an Kollagen Typ II erhöhte sich im Laufe der Expositionszeit und es fand sich eine signifikante Zunahme nach 24-stündiger RPM-Exposition (Abb. 12).

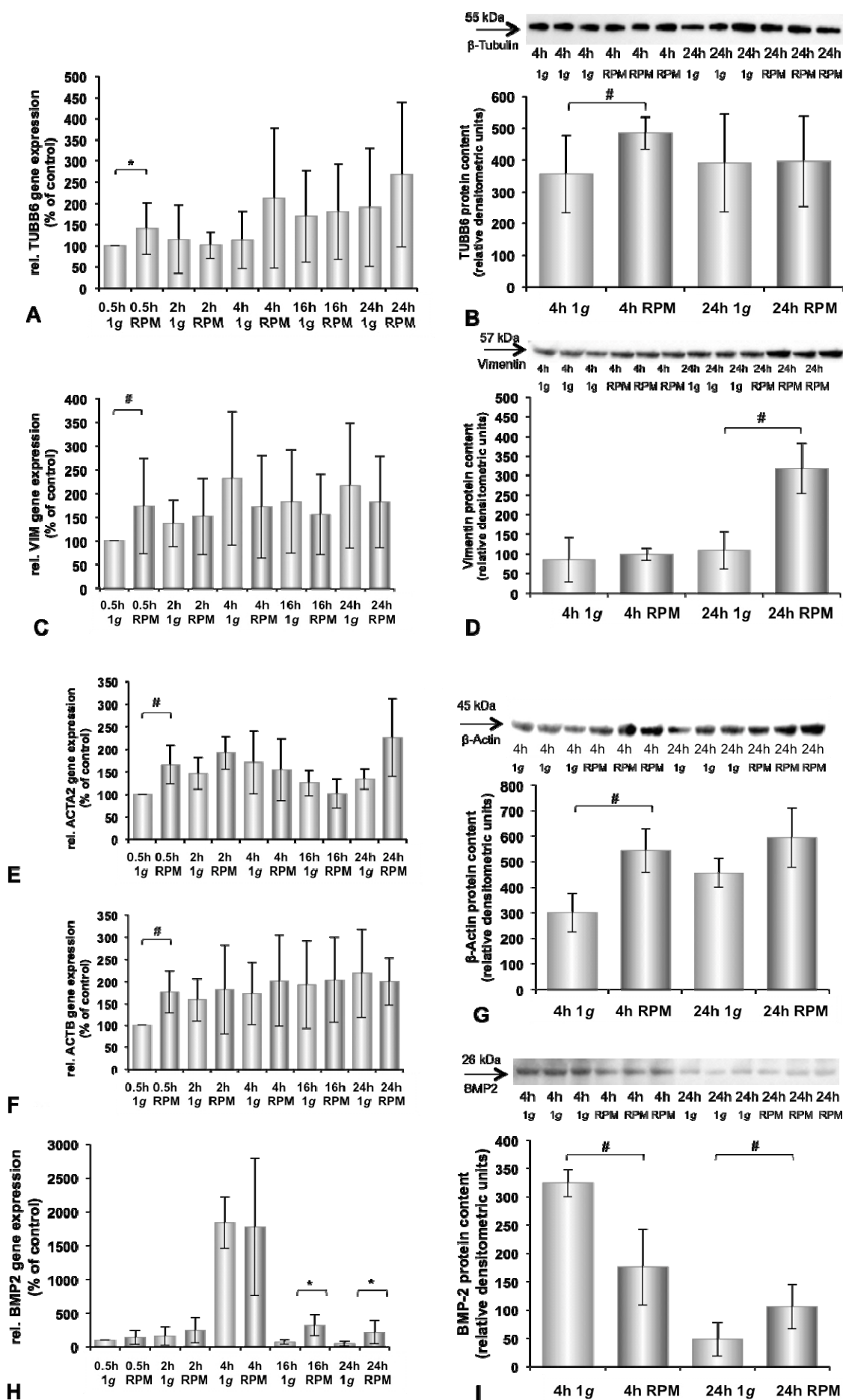


**Abbildung 12: Western Blot Analyse von Kollagen II nach Kurzzeit-Exposition auf der RPM**

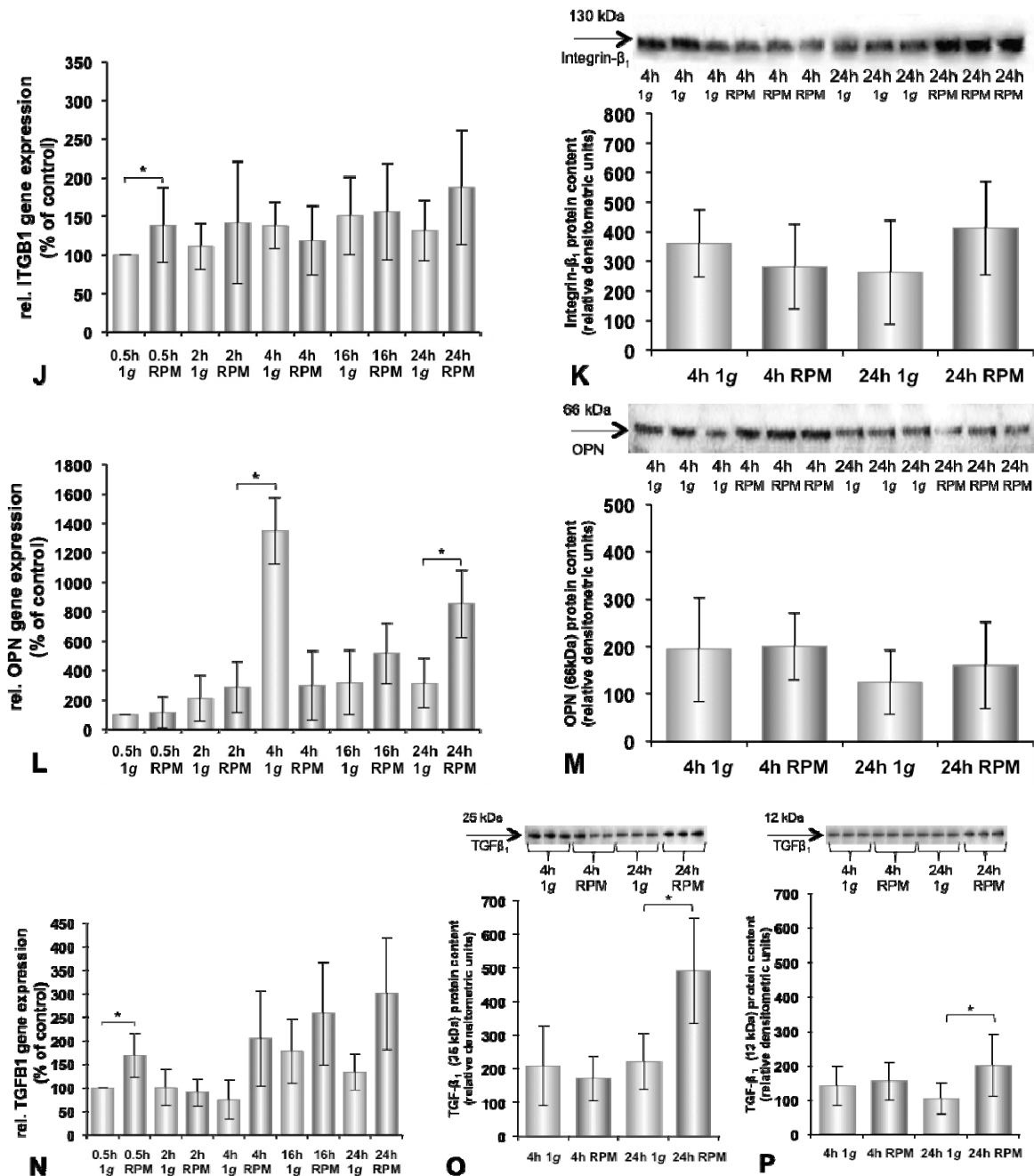
Die Western Blot Analyse von Kollagen II der für 4 h und 24 h auf der RPM kultivierten Chondrozyten und den entsprechenden statischen 1g-Kontrollkulturen. Die Daten wurden in Aleshcheva et al. 2013 publiziert. #P<0,005.

In einer Vielzahl von Versuchen unter simulierter und realer Mikrogravitation wurde mit Gene Array-Untersuchungen und PCR-Analysen die Genexpression zahlreicher Gene ermittelt und deren Veränderungen festgestellt (Carmeliet und Bouillon 1999, Hammond et al. 2000, Grosse et al. 2012, Ma et al. 2013, Ma et al. 2014). Außer dem *BMP2*-Gen wurden alle untersuchten Gene der Chondrozyten bereits nach 30-minütiger RPM-Exposition hochreguliert (Abb. 13) (Aleshcheva et al. 2013). Im Vergleich zu den Bodenkontrollen blieben die *ACTA2*, *ACTB*, *TUBB6*, *ITGB1* und *TGFB1* Gene auch nach 2-, 4-, 16- und 24-stündiger RPM-Exposition hochreguliert (Abb. 13A, 13E, 13F, 13J, 13N). Das *VIM*-Gen wurde nach 4 h nicht signifikant herunterreguliert, und nach 16 h und 24 h Inkubation auf der RPM blieb es ebenfalls herunterreguliert (Abb. 13C). Die *BMP2* und *OPN*-Gene zeigten eine starke Herunterregulation nach 4 h Inkubation im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen (Abb. 13H, 13L) (Aleshcheva et al. 2013).

Nach 24-stündiger RPM-Exposition wurden erhöhte Proteingehalte für Vimentin, beta-Aktin, BMP-2, TGF- $\beta_1$  und beta-Tubulin ermittelt (Abb. 13B, 13D, 13G, 13O, 13P). 4 h und 24 h simulierte Mikrogravitation haben den Proteingehalt von  $\beta_1$ -Integrin (Abb. 13J), Osteopontin (Abb. 13L) und Kollagen Typ II (Abb. 12) nicht beeinflusst (Aleshcheva et al. 2013).







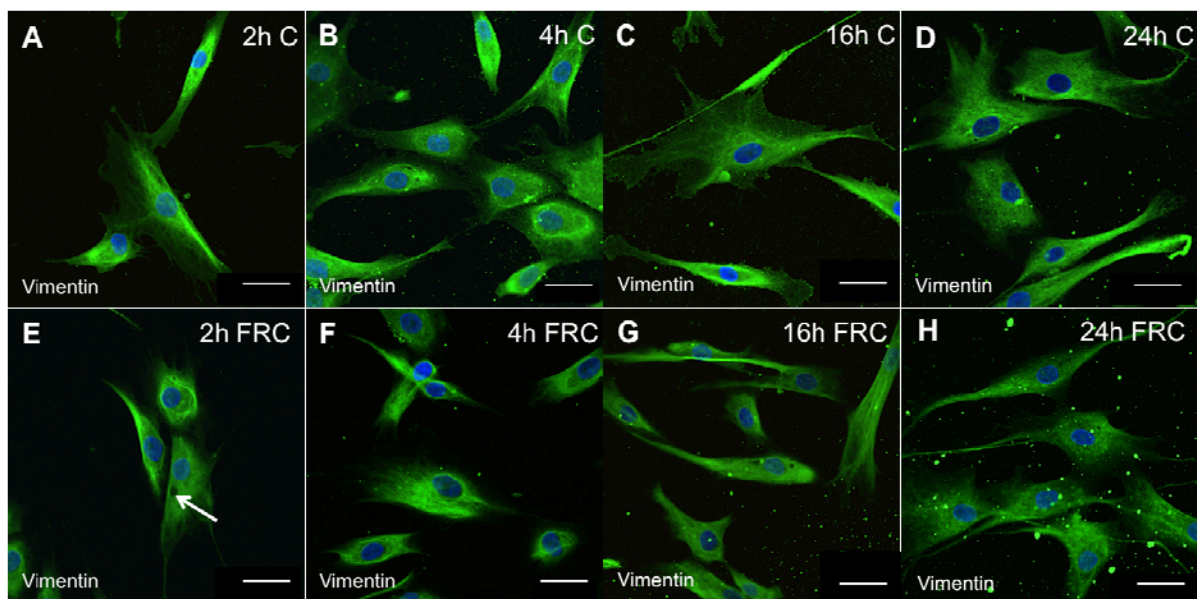
**Abbildung 13: Genexpression und Proteingehalt der Chondrozyten nach der Kurzzeit-Exposition auf der RPM**

qPCR von *TUBB6* (A), *VIM* (C), *ACTA2* (E), *ACTB* (F), *BMP2* (H), *ITGB1* (J), *OPN* (L) und *TGFβ1* (N) Genen zur Darstellung der Genexpression der für 30 min, 2 h, 4 h, 16 h und 24 h auf der RPM kultivierten Chondrozyten im Vergleich zu den entsprechenden 1g-Kontrollen. Western Blots von β-Tubulin (B), Vimentin (D), β-Aktin (G), BMP-2 (I), Integrin-β<sub>1</sub> (K), Osteopontin (M) und TGF-β<sub>1</sub> (O, P) zur Bestimmung des Proteingehalts der für 30 min, 2 h, 4 h, 16 h und 24 h auf der RPM kultivierten Chondrozyten im Vergleich zu den entsprechenden 1g-Kontrollen. \*P<0,05. Diese Daten wurden in Aleshcheva et al. 2013 publiziert.

### 3.1.2 Einfluss von FRC-Exposition auf Chondrozyten

Um mehr über die Sphäroidbildung zu erfahren und zelluläre Veränderungen zu erforschen, wurden Monolayer-Kulturen von Chondrozyten 2, 4, 16 und 24 h in DMEM/F-12-Medium auf dem FRC kultiviert und die erzielten Ergebnisse mit den entsprechenden statischen Kontrollen und den auf der RPM beobachteten Änderungen verglichen.

Es zeigte sich, dass die Chondrozyten auf die veränderten Schwerkraftbedingungen auf der RPM und auf dem FRC ähnlich reagieren. Bereits nach 2 h der Klinostaten-Exposition wurden Löcher im Vimentin-Netz und perinukleäre Ansammlungen von Vimentin beobachtet (Abb. 14E, Tab. 1). Allerdings konnten in den Zellen auf dem FRC keine Löcher mehr im Vimentin-Netzwerk nach 4h, 16h und 24h beobachtet werden (Abb. 14F-H).



**Abbildung 14: Immunfluoreszenz-Färbungen von Chondrozyten nach FRC-Exposition**

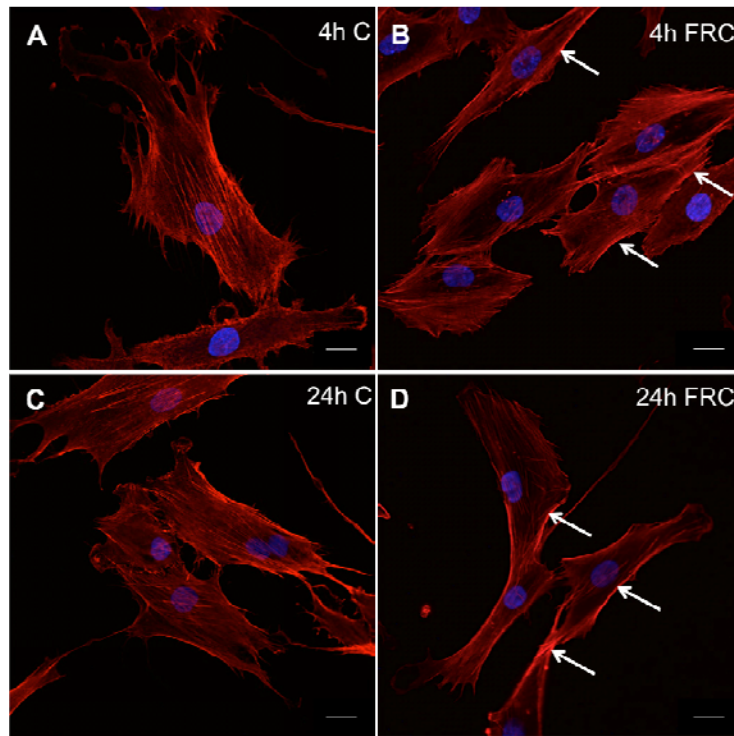
Chondrozyten kultiviert unter normalen 1g-Bedingungen (A-D) oder auf dem FRC (E-H) für 2 h (A, E), 4 h (B, F), 16 h (C, G) und 24 h (D, H). C – Kontrolle, FRC – Klinostat. Maßstabsbalken – 20  $\mu$ m.

Vimentin wurde perinukleär akkumuliert und es wurden Löcher im Vimentin-Netzwerk beobachtet (Pfeil), wobei bei den unter 1g kultivierten Chondrozyten keine Veränderungen im Vimentin-Netzwerk beobachtet werden konnten.

Tabelle 1: Veränderungen von Chondrozyten nach RPM-, FRC- und RWV-Exposition

Parameter	RPM (Aleshcheva et al. 2013)		FRC (Aleshcheva et al. 2015)		RWV (Aleshcheva et al. 2015)	
	Veränderung	Zeitpunkt	Veränderung	Zeitpunkt	Veränderung	Zeitpunkt
<b>Sphäroidbildung Größe</b>	Ja 20 µm	Ab 5-7. Tag	Ja 20 µm	Ab 5-7. Tag	Ja 3 mm	Ab 3. Tag
<b>Vimentin</b>	Löcher im Netzwerk	2 h	Löcher im Netzwerk	2 h	Nicht untersucht	
	Perinukleäre Akkumulation	2 h	Perinukleäre Akkumulation	2 h		
<b>F-Aktin</b>	Stressfasern	4 h	Stressfasern	4 h		
	Stressfasern (kortikal lokalisiert und in der Länge und Dicke reduziert)	24 h	Stressfasern (kortikal lokalisiert und in der Länge und Dicke reduziert)	24 h		
<b>Genexpression</b>	Erhöhte Expression: <i>ACTA2</i> , <i>ACTB</i> , <i>VIM</i> , <i>TUBB6</i> , <i>ITGB1</i> , <i>TGFB1</i>	30 min	Nicht untersucht		Nicht untersucht	
<b>Morphologie</b>	Vitale, nicht dedifferenzierte Zellen		Vitale, nicht dedifferenzierte Zellen		Vitale Zellen (Differenzierungsgrad der Zellen konnte nicht beurteilt werden, weil die Zellen in der Suspension vorlagen)	

Wie durch die F-Aktin-Färbung gezeigt, wurde die Form der auf dem FRC kultivierten Chondrozyten verändert: Kortikal lokalisierte Stressfasern wurden nach 4-stündiger Exposition im Vergleich zu den 1g-Kontrollen sichtbar (Abb. 15B, Tab. 1). Im Vergleich zu den Kontrollzellen wurden die Fasern in ihrer Länge und Dicke bei weiterer Inkubation bis 24 h reduziert (Abb. 15D). In den statischen 1g-Kontrollen hingegen konnten keine Stressfasern beobachtet werden (Abb. 15A, 15C).



**Abbildung 15: F-Aktin-Färbungen von auf dem FRC kultivierten humanen Chondrozyten**

Die F-Aktin-Färbung von Chondrozyten kultiviert für 4 h (A) und 24 h (C) unter 1g, sowie 4 h (B) und 24 h (D) auf dem FRC. Maßstabsbalken – 10 µm.

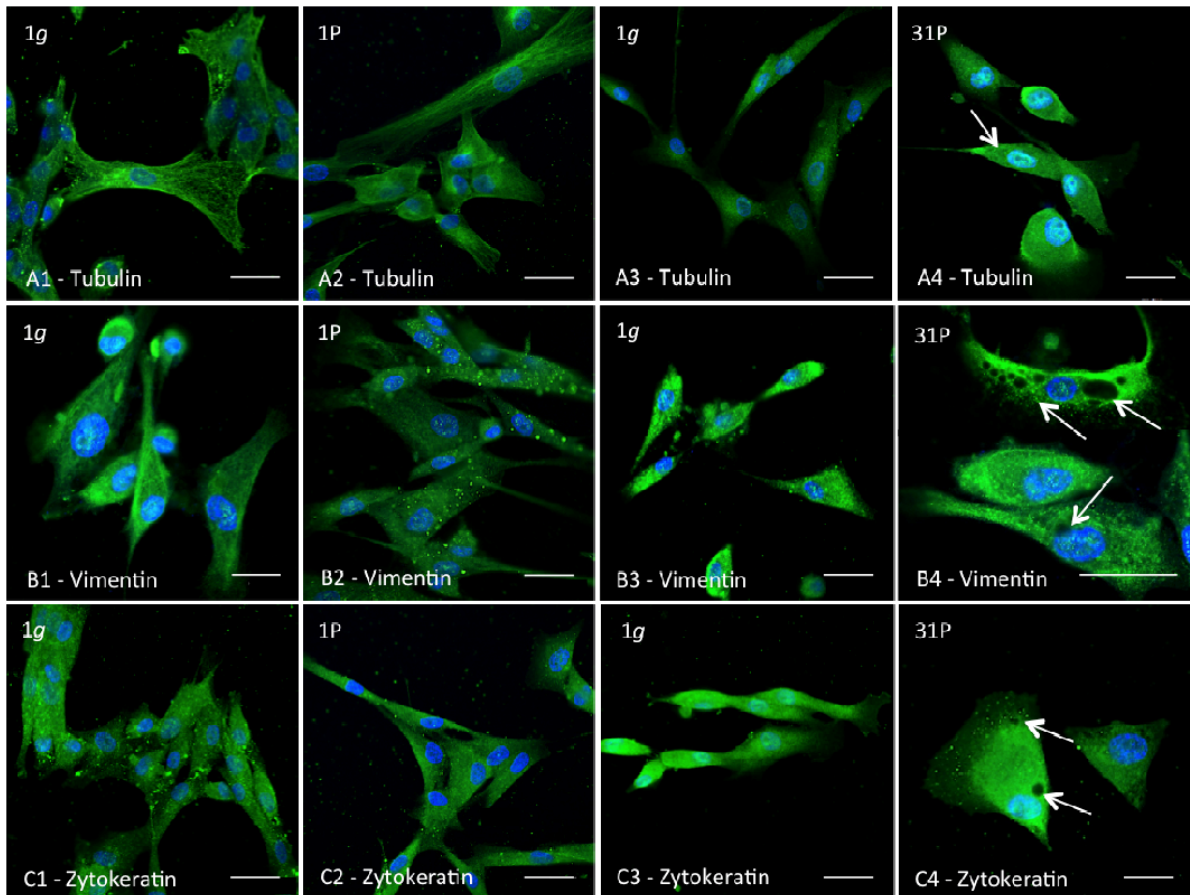
Nach 4 h sind Aktin-Stressfasern in der Anzahl, der Dicke und Länge reduziert (Pfeile). Nach 24 h ist F-Aktin kortikal lokalisiert (Pfeile).

### 3.2 Veränderungen von Chondrozyten unter realer Kurzzeit-Schwerelosigkeit

Die unter realer Kurzzeit-Schwerelosigkeit auftretenden Zytoskelett-Veränderungen der Chondrozyten wurden während eines Parabelfluges (24. DLR Parabelflugkampagne) auf dem Airbus A300 ZERO-G erstmals untersucht und in dieser Doktorarbeit beschrieben (Aleshcheva et al. 2015, Wehland und Aleshcheva et al. 2015). Ein wichtiges Ziel dabei war festzustellen, ob die Chondrozyten möglichen Schäden, die durch das plötzliche Entfernen des Schwerkrafteinflusses entstehen, entgegenwirken können.

#### 3.2.1 Zytoskelett-Veränderungen in der Schwerelosigkeit

Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass nach 31 Parabeln im Zytoskelett von Chondrozyten Löcher entstanden sind (Abb. 16A4, 16B4, 16C4), die jedoch nach der ersten Parabel (22 s) oder in den Bodenkontrollen nicht sichtbar waren (Abb. 16A2, 16B2, 16C2) (Aleshcheva et al. 2015). Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Zytoskelett von Chondrozyten gegenüber einer Kurzzeit-Mikrogravitation (22 s) beständig ist.

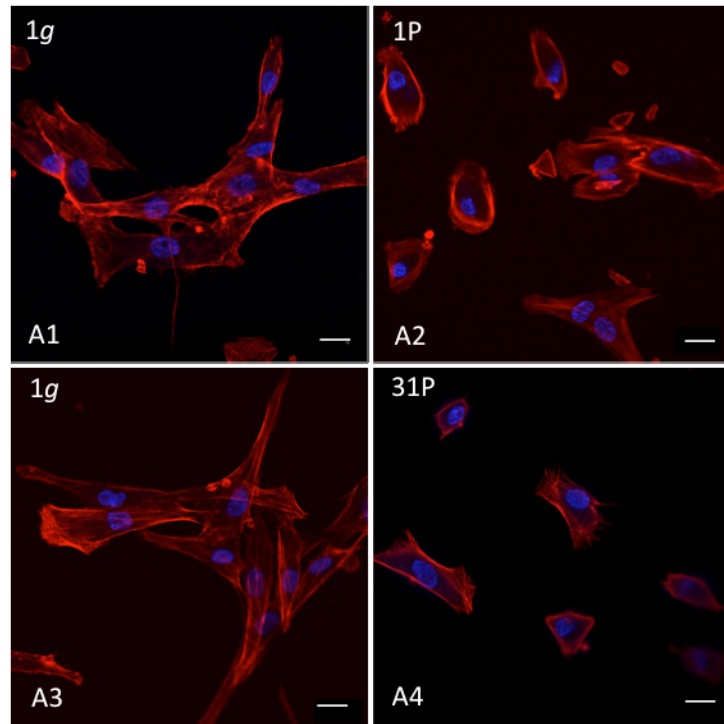


**Abbildung 16: Immunfluoreszenz-Färbungen der zytoskelettalen Komponenten nach Parabelflug-Exposition**

Immunfluoreszenz-Färbungen von Tubulin (**A1-A4**), Vimentin (**B1-B4**) und Zytokeratin (**C1-C4**) nach einer (1P) (**A2, B2, C2**) und nach 31 Parabeln (31P) (**A4, B4, C4**) mit entsprechenden Bodenkontrollen (1g) (**A1, A3, B1, B3, C1, C3**). Pfeile deute auf die Löcher im Netzwerk. Maßstabsbalken – 10  $\mu\text{m}$ .

Diese Daten wurden in Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

Nach einer Mikrogravitationsphase von 22 s wurde eine Umlagerung des Aktin-Netzwerkes in Form eines Ringes um die Zellmembran festgestellt (Abb. 17A2) (Aleshcheva et al. 2015). Der Ring war auch nach 31 Parabeln sichtbar (Abb. 17A4). Die Stressfasern waren nach der ersten Parabel (22 s) und auch nach der letzten Parabel nicht sichtbar (Abb. 17 A2) (Aleshcheva et al. 2015).



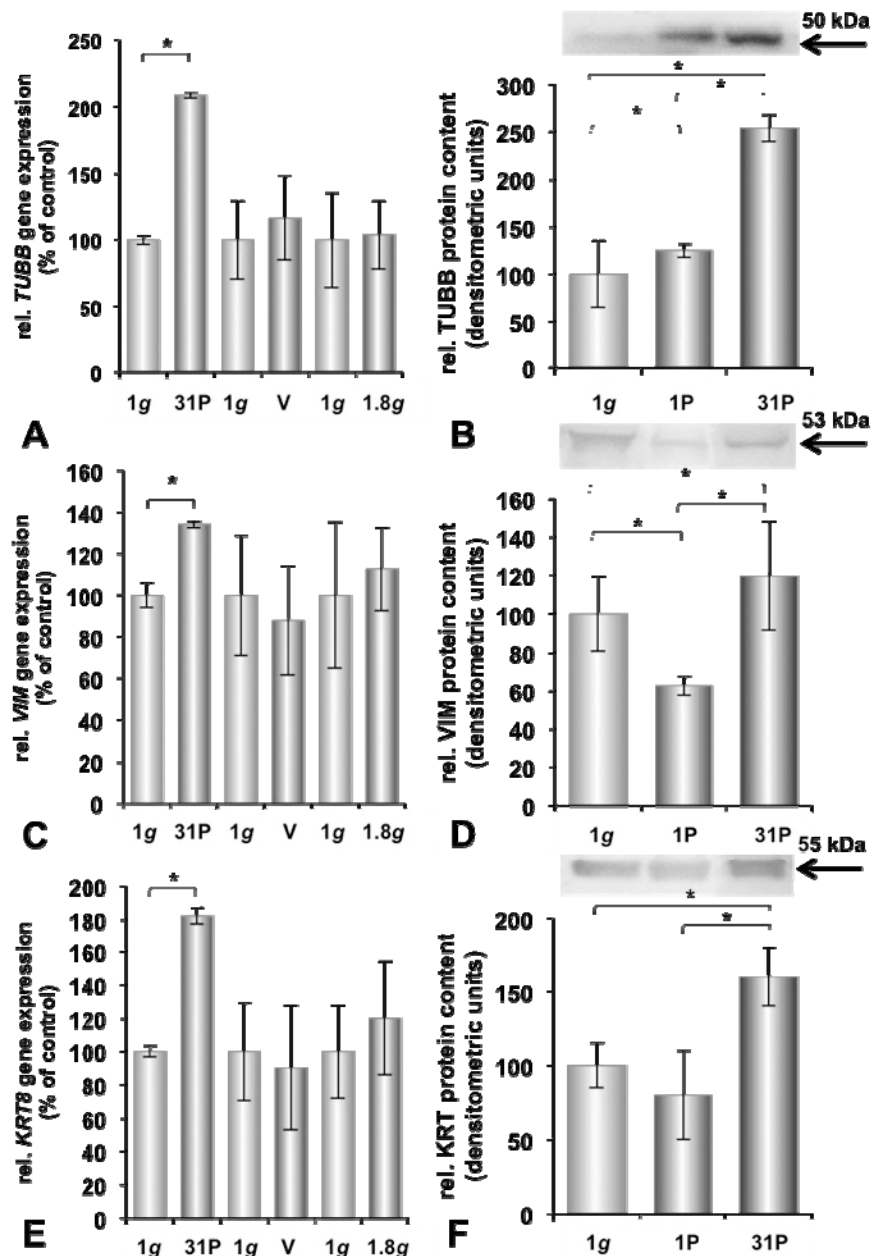
**Abbildung 17: Verteilung des F-Aktins in den Chondrozyten beim Parabelflug**

F-Aktin-Färbung der Chondrozyten nach einer (1P) (A2) und 31 Parabellen (31P) (A4) mit entsprechenden Bodenkontrollen (1g) (A1, A3). Maßstabsbalken – 10  $\mu\text{m}$ .

Diese Daten wurden in Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

Nach den realen Mikrogravitationsbedingungen während eines Parabelfluges wurden die Genexpression und der Proteingehalt von beta-Tubulin, Vimentin und Zytokeratin untersucht (Abb. 18) (Aleshcheva et al. 2015). Nach 31 Parabellen zeigten sich allgemein eine erhöhte Genexpression und ein vermehrter Proteingehalt: Die mRNA-Expression von beta-Tubulin wurden 2-fach (Abb. 18A) und der Proteingehalt 2,5-fach (Abb. 18B), die mRNA-Expression von Vimentin 1,3-fach (Abb. 18C) und der Proteingehalt 1,2-fach (Abb. 18D), und die Zytokeratin mRNA 1,8-fach (Abb. 18E) sowie der Proteingehalt 1,5-fach (Abb. 18F) signifikant erhöht gemessen.



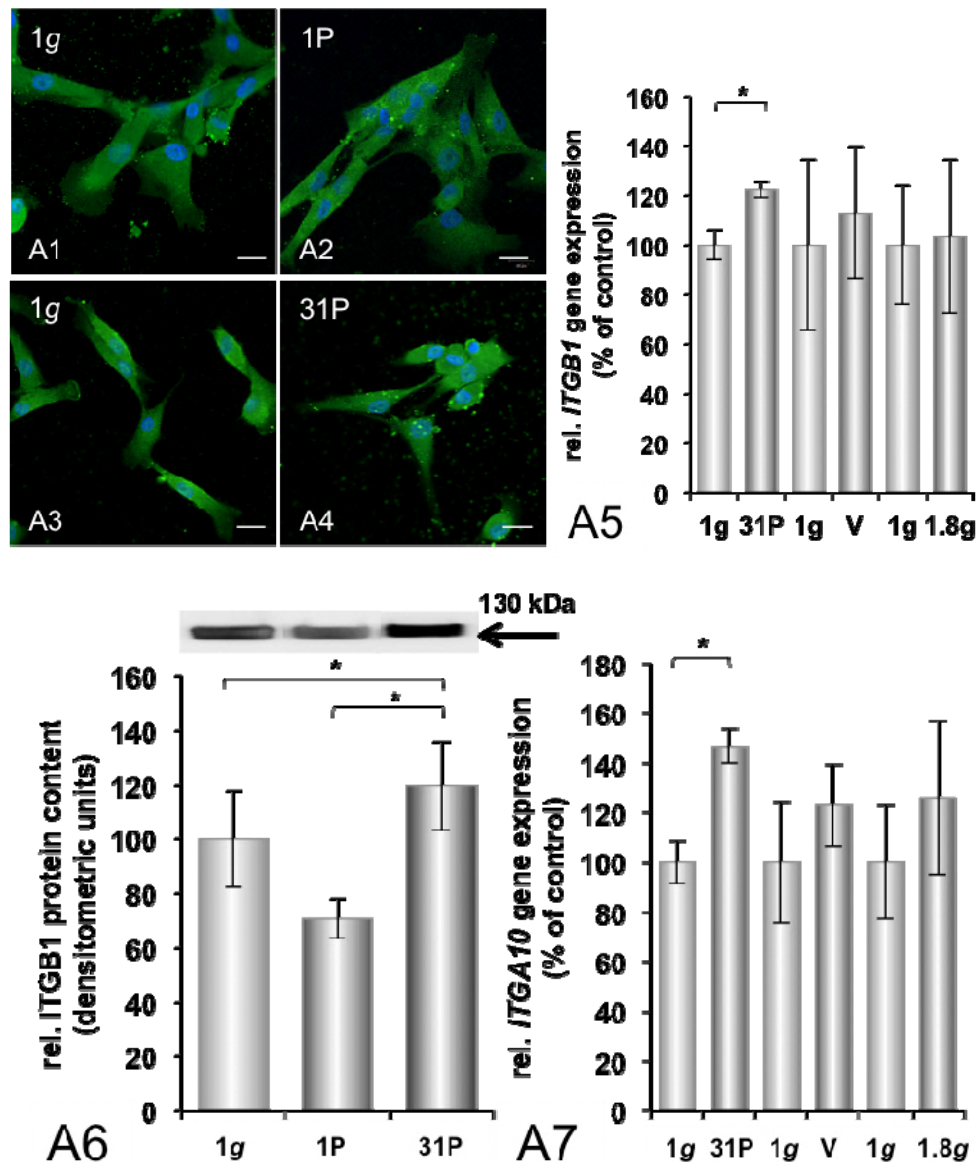


**Abbildung 18: Genexpression und Proteingehalt der Chondrozyten beim Parabellflug**

qPCR von *TUBB6* (A), *VIM* (C), *KRT8* (E) Genen zur Darstellung der Genexpression der Chondrozyten nach einer (1P) und nach 31 Parabeln (31P) im Vergleich zu den entsprechenden Bodenkontrollen (1g). Western Blots von  $\beta$ -Tubulin (B), Vimentin (D), Zytokeratin (F) zur Darstellung des Proteingehalts der Chondrozyten nach der ersten und der 31. Parabel im Vergleich zu den korrespondierenden 1g-Kontrollen. \* $P < 0,05$ .

Diese Daten wurden in Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

Es wurden keine Veränderungen in Bezug auf die Verteilung des  $\beta_1$ -Integrins nach einer und nach 31 Parabeln im Vergleich zu den entsprechenden Bodenkontrollen festgestellt (Abb. 19). Die Genexpression von  $\beta_1$ -Integrin war 1,2-fach erhöht (Abb. 19A5). Ein ähnliches Ergebnis wurde für die mRNA von  $\alpha_{10}$ -Integrin festgestellt (Abb. 19A7), die nach 31 Parabeln 1,5-fach erhöht gemessen wurde (Aleshcheva et al. 2015).



**Abbildung 19: Veränderung von  $\beta_1$ -Integrin in Chondrozyten beim Parabellflug**

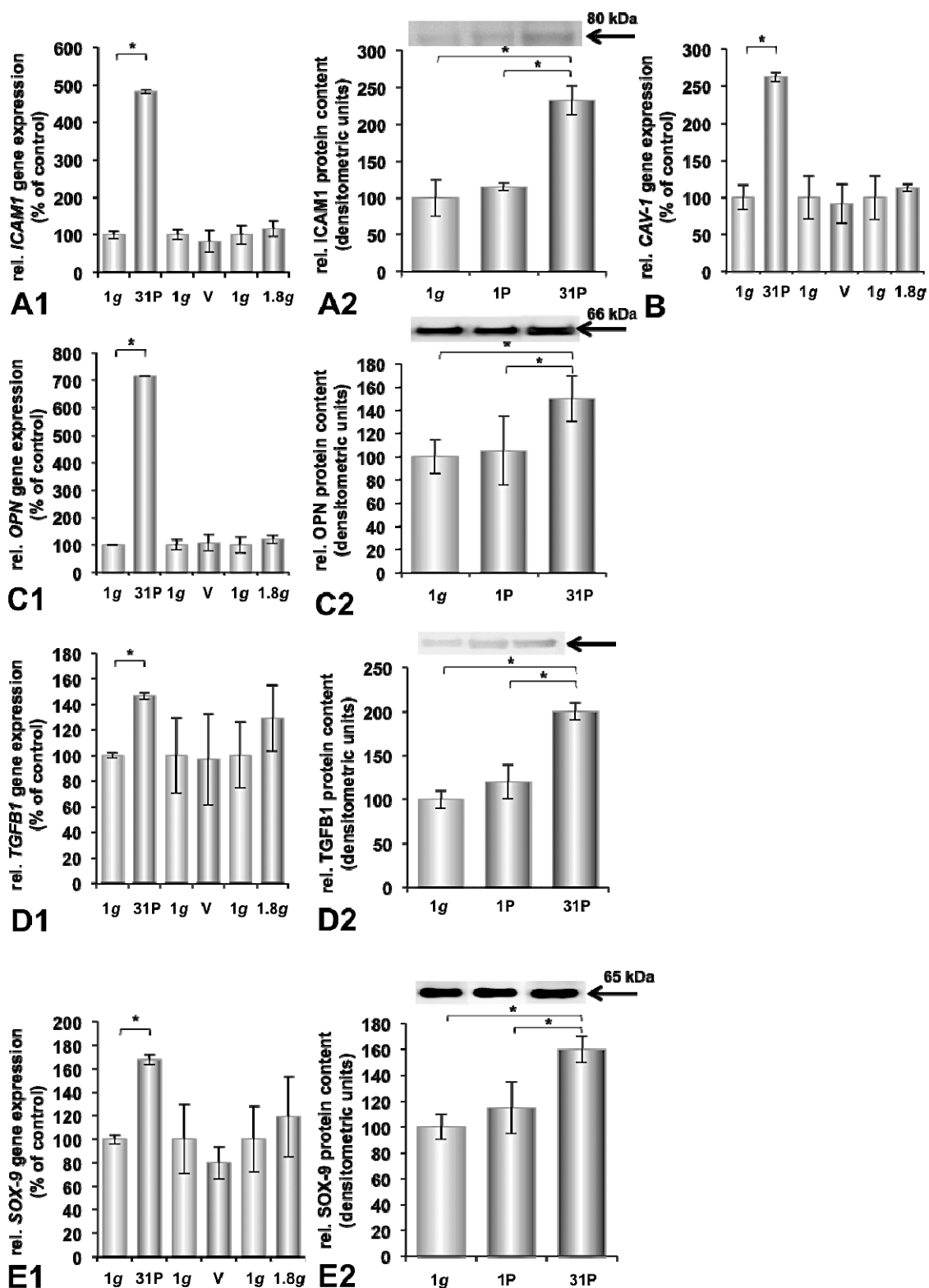
Immunfluoreszenz-Färbungen (A1-A4), qPCR (A5) und Western Blot Analyse (A6) von  $\beta_1$ -Integrin und qPCR von *ITGA10* (A7) der Chondrozyten nach der Parabellflug-Exposition (einer (1P) und 31 Parabelln (31P)) im Vergleich mit entsprechenden unter normalen Schwerkraftbedingungen kultivierten Bodenkontrollen (1g). Maßstabsbalken – 10  $\mu\text{m}$ . \* $P < 0,05$ .

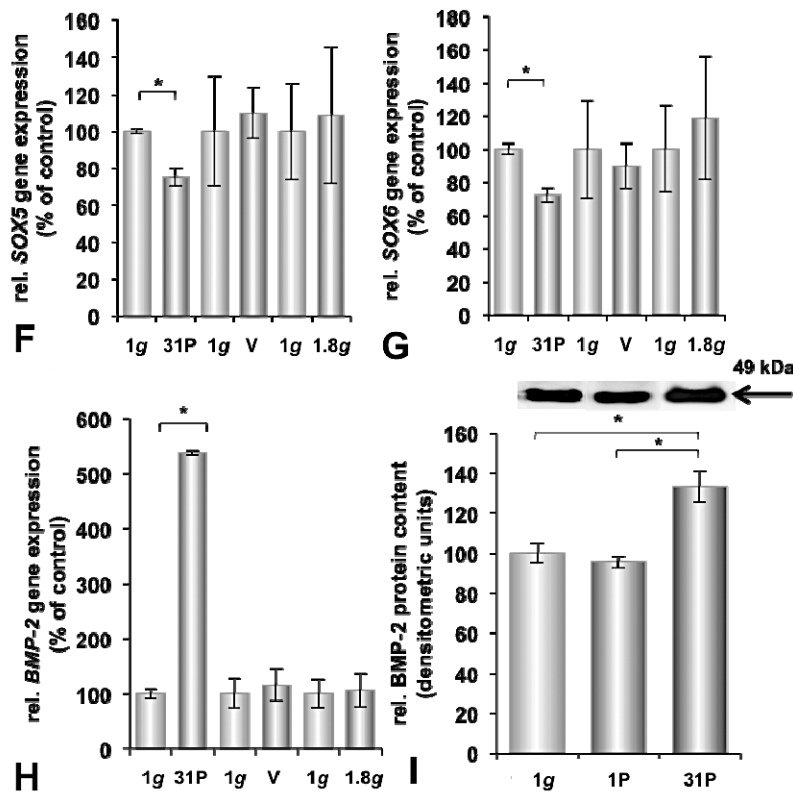
Diese Daten wurden in Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

### 3.2.2 Genexpressions- und Proteinveränderungen in der Schwerelosigkeit

Die qPCR-Analyse ergab eine Veränderung des Genexpressionsmusters von 14 Genen (Abb. 20). Nach 31 Parabelln wurden *TGFB1* (1,5-fach), *ICAM1* (4,8-fach), *CAV1* (2,6-fach), *SOX9* (1,7-fach), *OPN* (7-fach) und *BMP-2* (5,3-fach) signifikant hochreguliert, wobei *SOX5* (-25 %) und *SOX6* (-28 %) signifikant herunterreguliert waren. Der Proteingehalt von ICAM-1 (2,3-fach), OPN (1,4-fach), TGF- $\beta_1$  (2-fach), *SOX9* (1,6-fach) und *BMP-2* (1,3-fach) wurde ebenfalls signifikant erhöht gemessen (Aleshcheva et al. 2015).



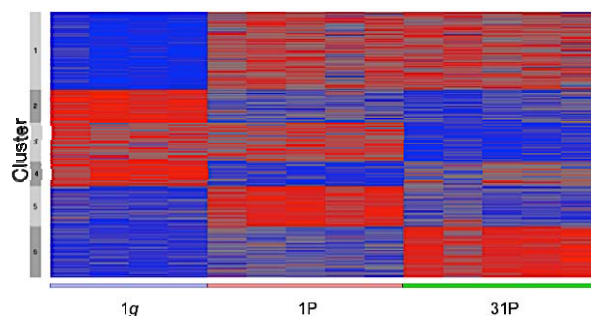




**Abbildung 20: Änderungen in der Genexpression und Proteingehalt durch den Parabelflug**

Darstellung der qPCR- und Western Blot -Ergebnisse von ICAM-1 (A1, A2), CAV-1 (B), OPN (C1, C2), TGFB1 (D1, D2), SOX9 (E1, E2), SOX5 (F), SOX6 (G) und BMP-2 (H, I) nach einer (1P), 31 Parabeln (31P), 2-stündiger Vibration (V) und 2-stündiger Hypergravitation (1,8g) verglichen mit den entsprechenden 1g-Kontrollproben. \* $P < 0,05$ . Diese Daten wurden in Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

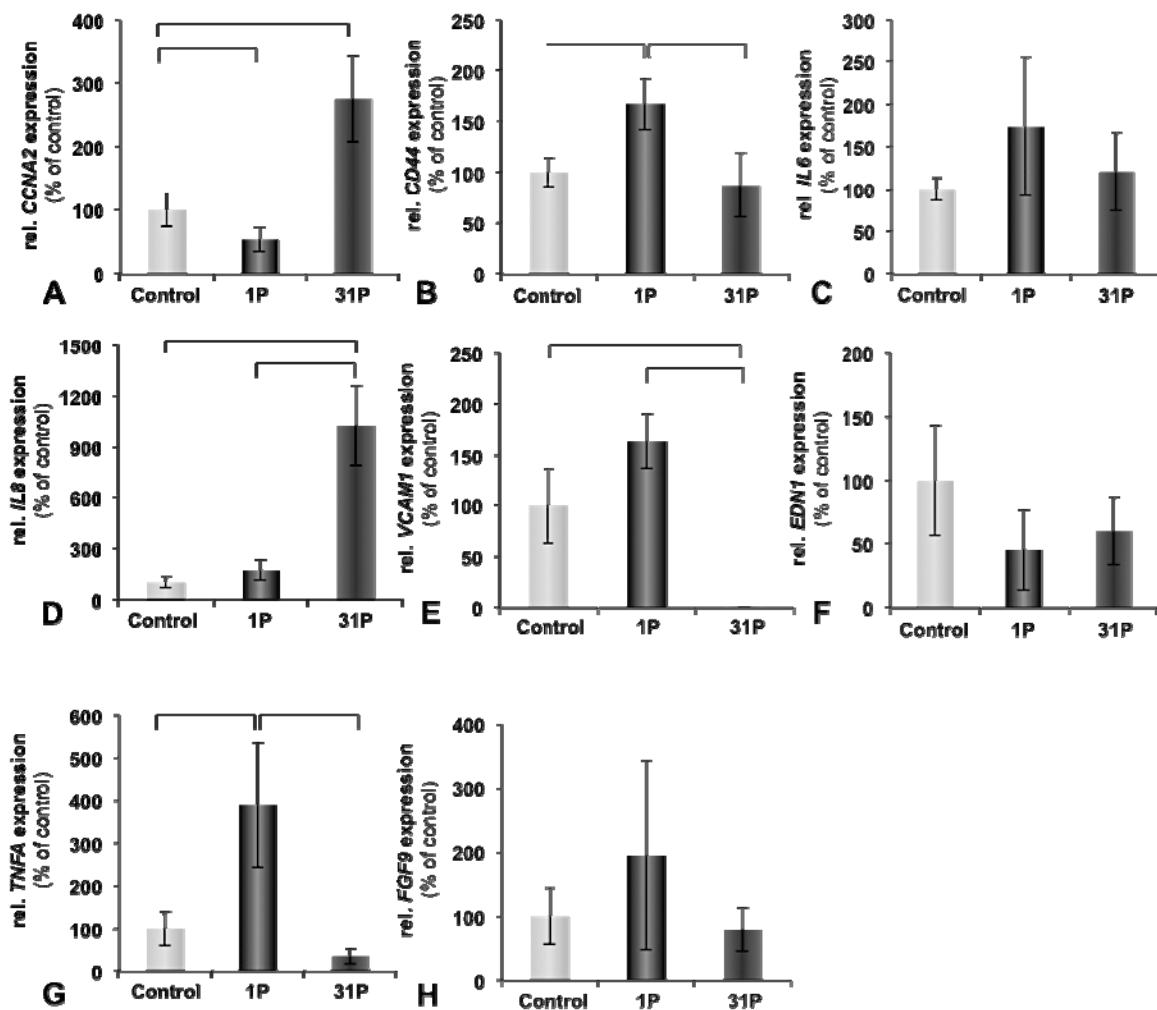
Mittels Microarray-Analyse konnte eine Veränderung des Genexpressionsmusters von insgesamt 112 Genen, die nach der ersten und 31. Parabel hochreguliert waren, festgestellt werden (Abb. 21) (Wehland und Aleshcheva et al. 2015). Davon wurden in erster Linie Transkriptions- und Metabolismus-Gene betroffen.



**Abbildung 21: Heatmap der Clusterbildung von unterschiedlich exprimierten Transkripten der Microarray-Experimente nach dem Parabelflug**

Analyse nach einer Parabel (1P) und 31 Parabeln (31P). Rot – starke Expression; blau – schwache Expression. Diese Daten wurden in Wehland und Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

Die Expression anti-apoptotischer Gene wie *VEGFA*, *NOTCH2* oder *HMGB1* konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Wehland und Aleshcheva et al. 2015). 51 Gene, die an der Transkription, dem Metabolismus und der Entwicklung beteiligt sind, wurden nach 31 Parabeln herunterreguliert (Wehland und Aleshcheva et al. 2015). 73 Gene, darunter *CCNA2* und *IL8*, waren erst nach der 31. Parabel signifikant hochreguliert (Abb. 22A, 22D). *CD44* und *TNFA* waren signifikant hochreguliert nur nach der ersten Parabel (Abb. 22B, 22G). *VCAM* waren signifikant herunterreguliert nach 31 Parabeln (Abb. 22E). Kein Effekt wurde bei *IL6*, *EDN1* und *FGF* beobachtet (Abb. 22C, 22F, 22H) (Wehland und Aleshcheva et al. 2015).



**Abbildung 22: qPCR Analyse von Chondrozyten nach dem Parabelflug**

qPCR Analyse von *CCNA2* (A), *CD44* (B), *IL6* (C), *IL8* (D), *VCAM1* (E), *EDN1* (F), *TNFA* (G), *FGF9* (H). Diese Daten wurden in Wehland und Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

### 3.2.3 Genexpressionsveränderungen durch Hypergravitation und Vibration

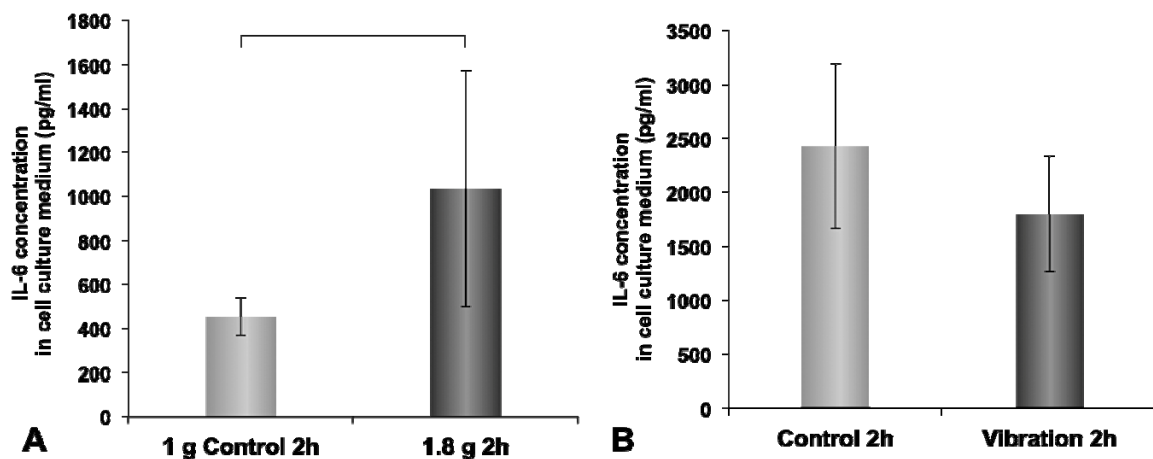
Da die Mikrogravitationsphase während eines Parabelfluges von zwei Hypergravitationsphasen und Vibrationen des Flugzeugs begleitet wird, wurden deren Einflüsse auf die Chondrozyten separat am

Boden untersucht.

Während der Vibrations- und Hypergravitationsversuche konnten keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von *TUBB*, *VIM*, *KRT8*, *INTB1*, *INTA10*, *BMP-2*, *ACTB*, *ICAM1*, *CAV-1*, *OPN*, *TGFB1*, *SOX9*, *SOX5* und *SOX6* gefunden werden (Abb. 20, Aleshcheva et al. 2015).

Mittels Microarray-Analyse konnten die signifikanten Expressionsveränderungen von 210 Genen nach Hypergravitation (1,8g, 2 h) festgestellt werden, die für die embryonale Morphogenese, die Entwicklung des Skeletts und die Gewebemorphogenese verantwortlich sind, wobei viele der gefundenen Gene wie *VEGFA*, *BMP4*, *EDN1*, *BIRC3* oder *WNT5A* für die Knorpelentwicklung, Zelladhäsion und biologische Adhäsion verantwortlich sind (Wehland und Aleshcheva et al. 2015).

Hypergravitation rief außerdem eine 2-fache Erhöhung von IL-6 im Überstand hervor (Abb. 23), wobei die IL-8, EGF, VEGFD und FGF17 Proteinkonzentrationen im Überstand der Hypergravitationsproben unterhalb der Nachweisgrenze lagen (Wehland und Aleshcheva et al. 2015).

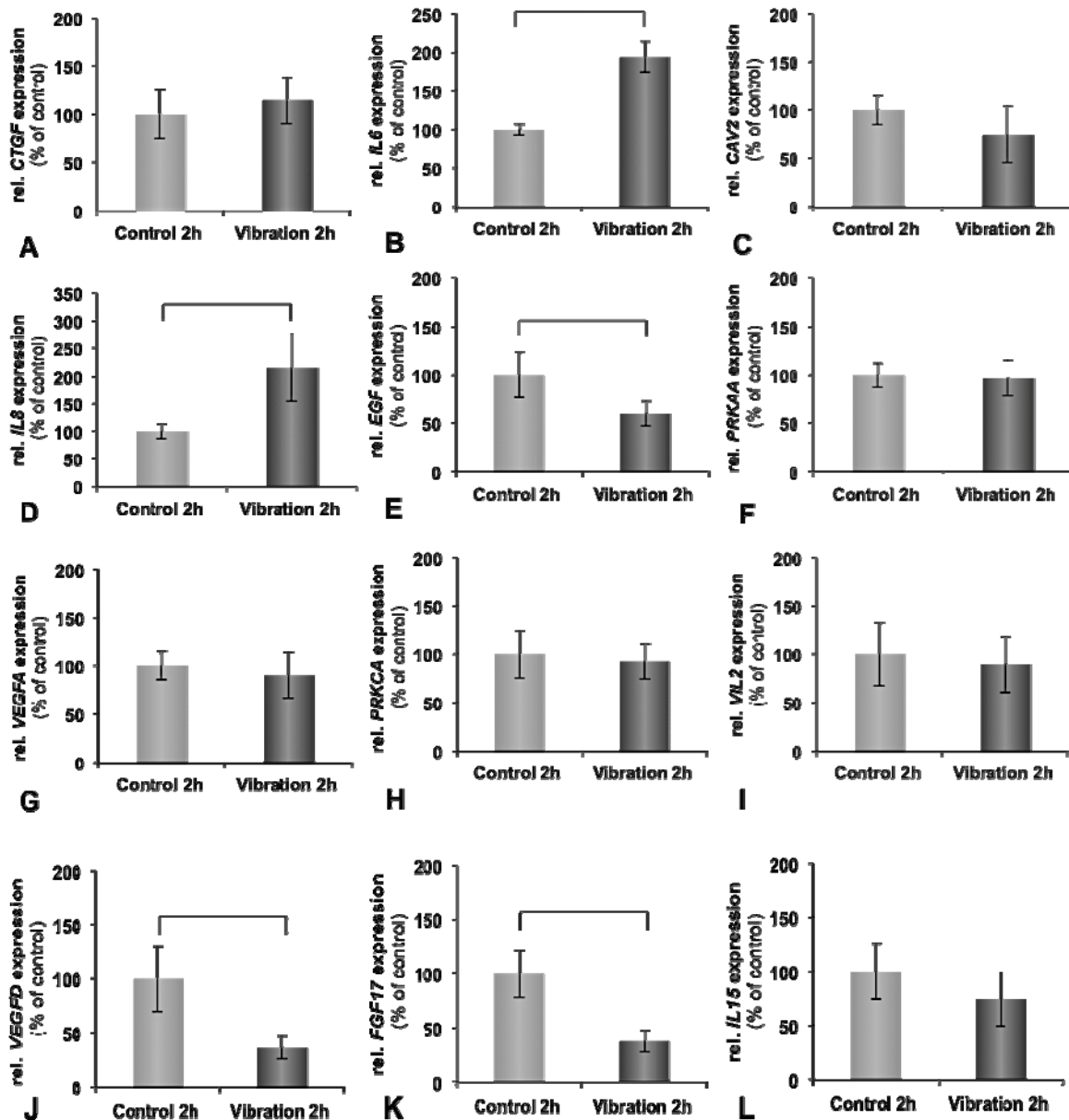


**Abbildung 23: ELISA von IL-6 in dem Zellkulturüberstand**

IL-6 Konzentrationen (pg/ml) im Zellkulturmedium nach der Expositionen der Chondrozyten der Hypergravitation (1,8g, 2 h) (A) und der Vibration (B). Der klare Anstieg in der Sekretion von IL-6 ist in den auf der Zentrifuge kultivierten Zellen im Vergleich zu den 1g-Kontrollproben sichtbar, wobei keine signifikanten Konzentrationsunterschiede im Zellkulturmedium von Vibrationsexperimenten im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden konnte.

Diese Daten wurden in Wehland und Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

Nach der 2-stündigen Vibration konnten die Herunterregulationen von *IL6*, *IL8*, *EGF*, *VEGFD*, *FGF17* festgestellt werden (Abb. 24B, 24D, 24E, 24J, 24K). Dafür wurden keine Veränderungen in der Genexpression von *CTGF*, *CAV2*, *PRKAA*, *VEGFA*, *PRKCA*, *VIL2*, *IL15* beobachtet (Abb. 24A, 24C, 24F, 24G, 24H, 24I, 24L) (Wehland und Aleshcheva et al. 2015).



**Abbildung 24: qPCR Analyse von Chondrozyten nach der Vibraplex-Exposition**

qPCR Analyse von *CTGF* (A), *IL6* (B), *CAV2* (C), *IL8* (D), *EGF* (E), *PRKAA* (F), *VEGFA* (G), *PRKCA* (H), *VIL2* (I), *VEGFD* (J), *FGF17* (K), *IL15* (L).

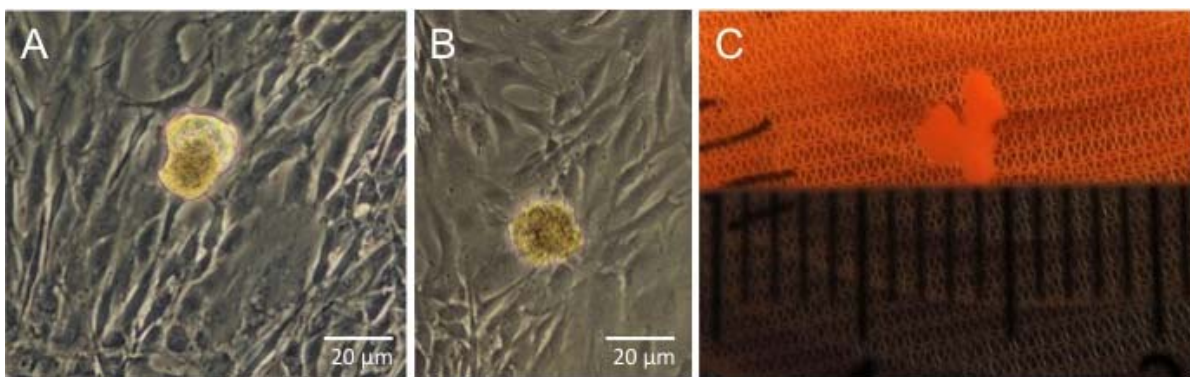
Diese Daten wurden in Wehland und Aleshcheva et al. 2015 publiziert.

### 3.3 Tissue Engineering des Knorpels

Kurzzeit-Experimente unter den Bedingungen der simulierten Mikrogravitation dienen der Vorbereitung der Langzeit-Tissue-Engineering-Versuche. Während der Arbeit wurden die Bodenanlagen wie die RPM, der FRC und die RWV für längere Zeit eingesetzt und miteinander im Hinblick auf die Sphäroidbildung verglichen.

### 3.3.1 Vergleich der Bodenanlagen

Während der Kultivierung auf der RPM oder dem FRC wuchsen die Knorpelzellen zweidimensional als adhärenente Monolayerkultur und als dreidimensionale Gewebe-stückchen. Die adhärenente Zellschicht diente als Ausgangspunkt für den Übergang vom 2- in ein 3-dimensionales Wachstum. Dieser Prozess ist ungefähr zwischen dem 5. und dem 7. Tag zu beobachten (Abb. 25A und 25B). Für RWV-Kulturen wurden die Chondrozyten aus technischen Gründen bereits in einer Zellsuspension zugegeben, was zu einer schnelleren Bildung größerer Sphäroide führte (Abb. 25C). Nach 7-tägiger Kultivierung entdeckten wir die Sphäroid-Bildung in den T25 Kulturflaschen auf der RPM (Abb. 25A) als in den Flasketten auf dem FRC (Abb. 25B). Die Zellen in der RWV begannen nach 3 Tagen sichtbare Sphäroide zu bilden, die am 7. Tag etwa 3 mm groß waren (Abb. 25C).



**Abbildung 25: Sphäroidbildung in den Bodenanlagen zur Mikrogravitationssimulation**

Humane Chondrozyten nach 7-tägiger Kultivierung auf der RPM (A), auf dem FRC (B) und in der RWV (C).

Die Sphäroidbildung als auch die Größe der gebildeten Sphäroide wurde durch das unterschiedliche Zellwachstum (adhärenente Zellen und Sphäroide) und möglicherweise auch durch die unterschiedlichen Betriebsarten der Geräte (2D vs. 3D) beeinflusst. Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass sich in allen drei Bodenanlagen die experimentellen Ansätze stark hinsichtlich Kulturvolumen und Behältergeometrie unterschieden (Tab. 2). Dies führte zu unterschiedlichen Behandlungen der kultivierten Zellen: Während das Medium in den Kulturflaschen auf der RPM (60 ml) und in der RWV (50 ml) zu 50 % jeden 3. Tag gewechselt werden musste, wurde das Medium in den Flasketten auf dem FRC (12 ml) jeden 2. Tag ausgetauscht.

**Tabelle 2: Unterschiede in der Chondrozyten-Handhabung in den Bodenanlagen.**

Parameter	RPM (Aleshcheva et al. 2013)	FRC	RWV
Zellen	Kryogen konservierte humane Chondrozyten aus dem menschlichen Gelenkknorpel (Provitro, Berlin, Germany)		
Trägermaterialien (scaffolds)	Ohne Trägermaterialien		
Kultivierungsgefäße	T25 Kulturflaschen	Flasketten	HARV- Einweggefäße
Kultivierungsmedium	DMEM/F-12 Medium + 10 % fetales Kälberserum + 100 IU Penicillin/mL + 100 µg Streptomycin/ml oder CGM mit und ohne Wachstumsfaktoren		
Kultivierungsvolumen	64 ml	10 ml	50 ml
	Komplett gefüllt		
Kultivierungszeit	7 Tage	7 Tage	7 Tage
Mediumwechsel	50 % jeden 3.Tag	50 % jeden 2.Tag	50 % jeden 3.Tag
Betriebsweise	60°/s (10 rpm) Real Random Mode	20 rpm Kontinuierlich	20 rpm Kontinuierlich

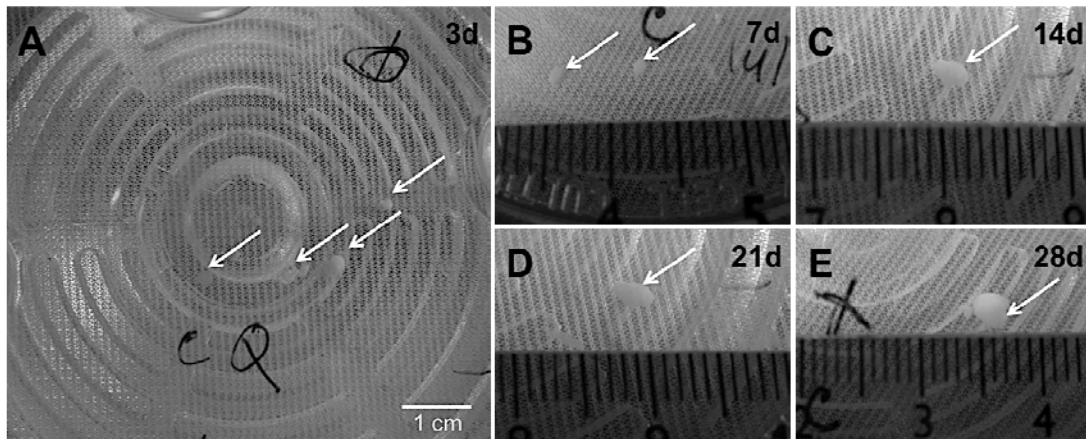
### 3.3.2 3D Knorpelgewebekonstruktion in der RWV

Während dieser Doktorarbeit wurde die 3D-Knorpelgewebekonstruktion in der RWV aus kryogen konservierten menschlichen Knorpelzellen ohne Zusatz von Trägermaterialien (scaffolds) oder anderen künstlichen unterstützenden Materialien untersucht. Zu diesem Zweck wurden menschliche Chondrozyten für 7, 14, 21 und 28 d in der RWV unter dynamischen laminaren Strömungsbedingungen mit niedrigen Scherkräften kultiviert. Nach jedem Zeitpunkt wurden die Zellen makroskopisch und mikroskopisch untersucht, histologisch und immunhistochemisch analysiert, um die Menge und Verteilung von extrazellulären Matrixkomponenten wie der Kollagene Typ I / II und des Proteoglykan Aggrecans zu bestimmen. Außerdem wurde das gezüchtete Gewebe auf die Anwesenheit von apoptotischen Zellen untersucht.

#### 3.3.2.1 Größe der in der RWV gebildeten Sphäroide

Es zeigte sich, dass Chondrozyten in der RWV Sphäroide (kleine 3D-Aggregate) bildeten, die bereits nach drei Tagen der Kultivierung sichtbar wurden (Abb. 26A). Am 7. Tag waren sie etwa zwei mm groß (Abb. 26B). Nach 28 Kultivierungstagen wurde die maximale Größe von 3,5 mm erreicht (Abb. 26E). Die makroskopische Untersuchung des produzierten Gewebes zeigte nach sieben Tagen RWV-Exposition eine abgerundete Morphologie der Zellen. Es fand sich eine kompakte Gewebestruktur und eine dichte Matrixproduktion (Abb. 27).



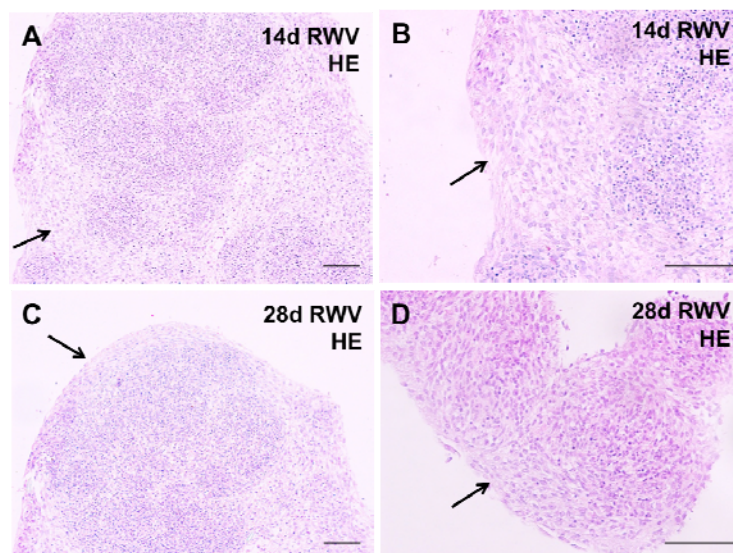


**Abbildung 26: Sphäroidbildung in der RWV**

Sphäroide (Pfeile) nach 3 Tagen (A), 7 Tagen (B), 14 Tagen (C), 21 Tagen (D) und nach 28 Tagen der Kultivierung in der RWV (E).

### 3.3.2.2 Zellmorphologie

Nach 14-tägiger RWV-Exposition besaßen die Chondrozyten im Sphäroid-Inneren eine abgerundete Form (Abb. 27A). An der Sphäroid-Oberfläche waren sie abgeflacht und parallel zur Oberfläche ausgerichtet (Abb. 27A-D, Pfeile). Die Sphäroidoberfläche bestand aus mehreren Schichten länglicher Fibroblasten-ähnlicher Zellen (Abb. 27D). Morphologisch zeigten die gebildeten Sphäroide eine zellreiche Organisation (Abb. 27). Jedoch waren die einzelnen Zellen in der Knorpelmatrix nicht deutlich sichtbar.



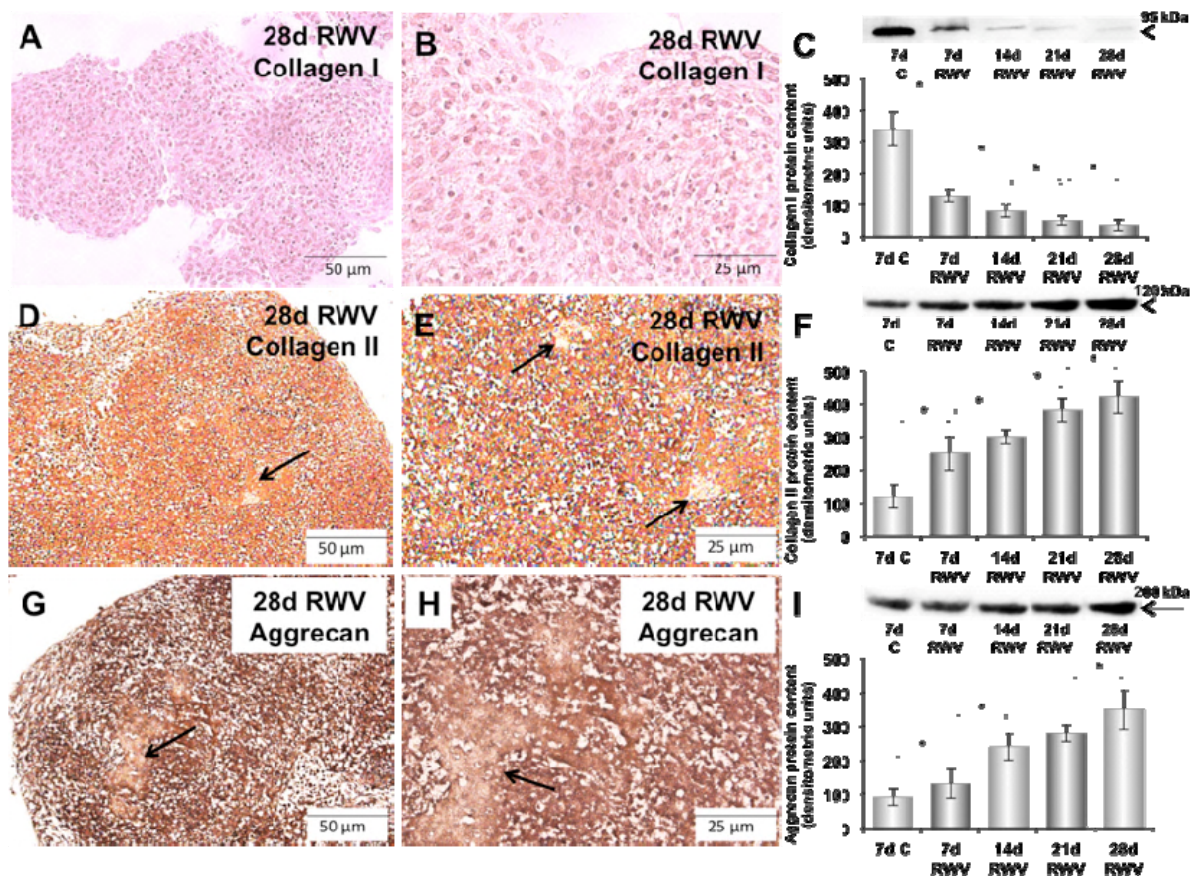
**Abbildung 27: Histologische Analyse des knorpelähnlichen Gewebes nach Bildung in der RWV**

A. Hämatoxylin Eosin (HE) Färbung von nach 14 Tagen in der RWV gebildeten Sphäroiden;  
 B. Zellmorphologie eines nach 14 Tagen gebildeten Sphäroids; C. HE-Färbung eines 28 Tage alten Sphäroids;  
 D. Zellmorphologie des 28 Tage alten RWV-Sphäroids. Die Pfeile zeigen auf die flachen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen. Maßstabsbalken – 50 µm.



### 3.3.2.3 Immunhistochemische Untersuchungen der gebildeten Sphäroide

Das knorpelähnliche Gewebe war Kollagen Typ I-negativ (Abb. 28A, 28B). Es fand sich eine starke positive Färbung für Kollagen Typ II (Abb. 28D, 28E). Diese Ergebnisse konnten durch Western Blot Analyse bestätigt werden (Abb. 28C, 28F). Ein analoges Ergebnis wurde für Aggrecan erzielt (Abb. 28G-I). Eine positives Färbungsergebnis fand sich für Aggrecan in den gleichen Bereichen wie für Kollagen Typ II.



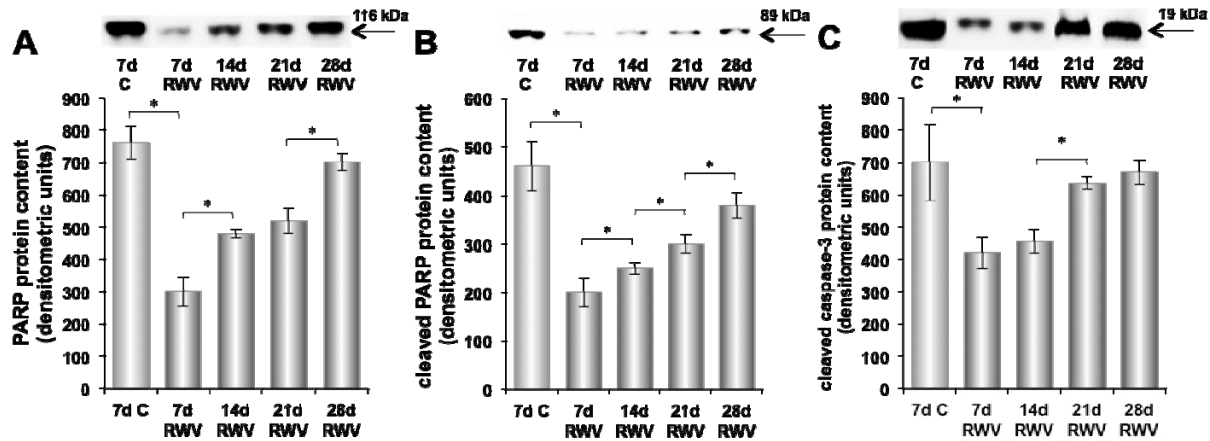
**Abbildung 28: Nachweis von knorpelspezifischen Bestandteilen in RWV-Sphäroiden**

Immunhistochemische Färbungen eines 28 Tage alten Sphäroids gegen Kollagen Typ I (A, B), Kollagen Typ II (D, E) und Aggrecan (G, H). Western Blot Analyse von Kollagen Typ I (C), Kollagen Typ II (F) und Aggrecan (I) Proteinen in Chondrozyten, die für 7 Tage unter normalen 1g-Bedingungen (7d C) sowie für 7, 14, 21, und 28 Tage in der RWV gezüchtet wurden. \*P<0,05.

Pfeile in D, E, G und H deute auf die inkonsistente Gewebestruktur.

### 3.3.2.4 Nachweis von apoptotischen Zellen im Sphäroid

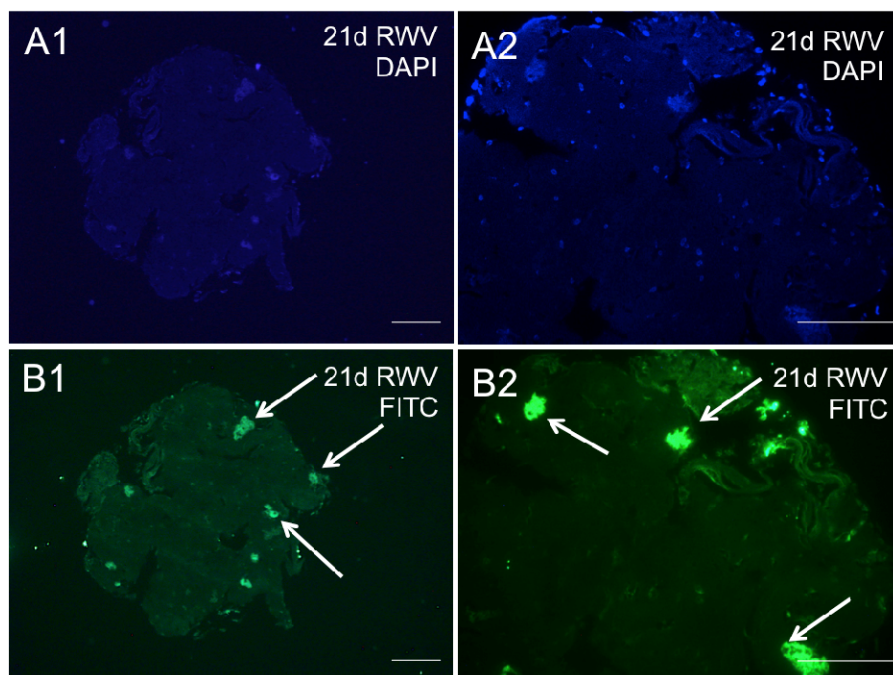
Im produzierten Gewebe wurde nach 21 Tagen kontinuierlicher Kultivierung in der RWV Apoptose nachgewiesen (Abb. 29). Der Gehalt an Apoptose-assoziiierter gespaltener Caspase-3 und Apoptose-verwandtem PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase) in den Sphäroiden war nach 28 Tagen genau so groß wie in den Zellen, die 7 Tage bei statischen 1g-Bedingungen kultiviert wurden (Abb. 29).



**Abbildung 29: Nachweis von Apoptose in den in der RWV produzierten Sphäroiden**

A-B. Protein-Gehalt von PARP in bei 1g (7d C) kultivierten Chondrozyten und in nach 7, 14, 21, und 28 Tagen in der RWV produziertem Gewebe; C. Protein-Gehalt von aktiver Caspase-3 (gespaltener Caspase-3) in den bei 1g (7d C) kultivierten Chondrozyten und in nach 7, 14, 21, und 28 Tagen in der RWV produziertem Gewebe. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Anstieg aktiver Caspase-3 und von PARP Fragmenten in den 21 und 28 Tage alten RWV-Sphäroiden. D. Proteingehalt von Vimentin in den unter normalen Gravitationsbedingungen (7d C) kultivierten Chondrozyten und in 7, 14, 21, und 28 Tage alten RWV Sphäroiden. \* $P < 0,05$ .

Wie mit dem FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit ermittelt, wurde durch das Auftreten eines starken FITC-Signals die Apoptose bestätigt (Abb. 30).



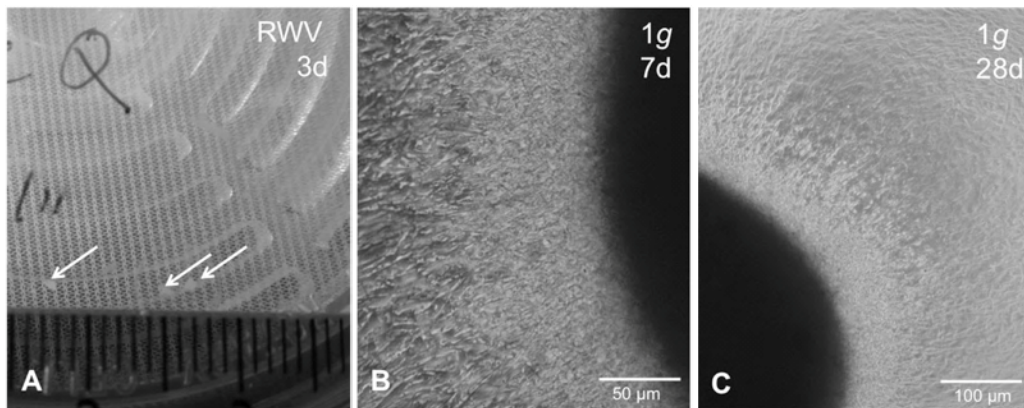
**Abbildung 30: Detektion der Apoptose in den in der RWV gebildeten Sphäroiden**

DAPI- (A1, A2) und FITC-Färbungen (B1, B2) eines für 21 Tage in der RWV kultivierten Sphäroids.

Maßstabsbalken – 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2.5 Rekultivierung von Sphäroiden unter normalen Schwerkraftbedingungen

Nachdem die 3 Tage alten Sphäroide aus der RWV entnommen und unter normalen Gravitationsbedingungen weiter kultiviert worden waren (Abb. 31A), konnte am 7. Tag eine radiale Zellausbreitung aus dem Sphäroid beobachtet werden (Abb. 31B). Nach 28 Tagen unter normalen Gravitationsbedingungen haben sich die Zellen wieder in eine Monolayer-Kultur verwandelt, wobei an der Stelle eines Sphäroids ein Zellklumpen zu sehen war (Abb. 31C).



**Abbildung 31: Verwandlung der 3 Tage alten Sphäroide zu einer Monolayer-Kultur**

**A.** Die 3 Tage alten in der RWV gebildeten Sphäroide. Pfeile deuten auf die Sphäroide; **B.** Radiale Zellausbreitung aus dem Sphäroid am 7. Kultivierungstag unter normalen Gravitationsbedingungen; **C.** Monolayer-Kultur mit Zellklumpen am 28. Kultivierungstag unter normalen Gravitationsbedingungen.

### 3.3.3 3D Knorpelgewebekonstruktion auf der RPM

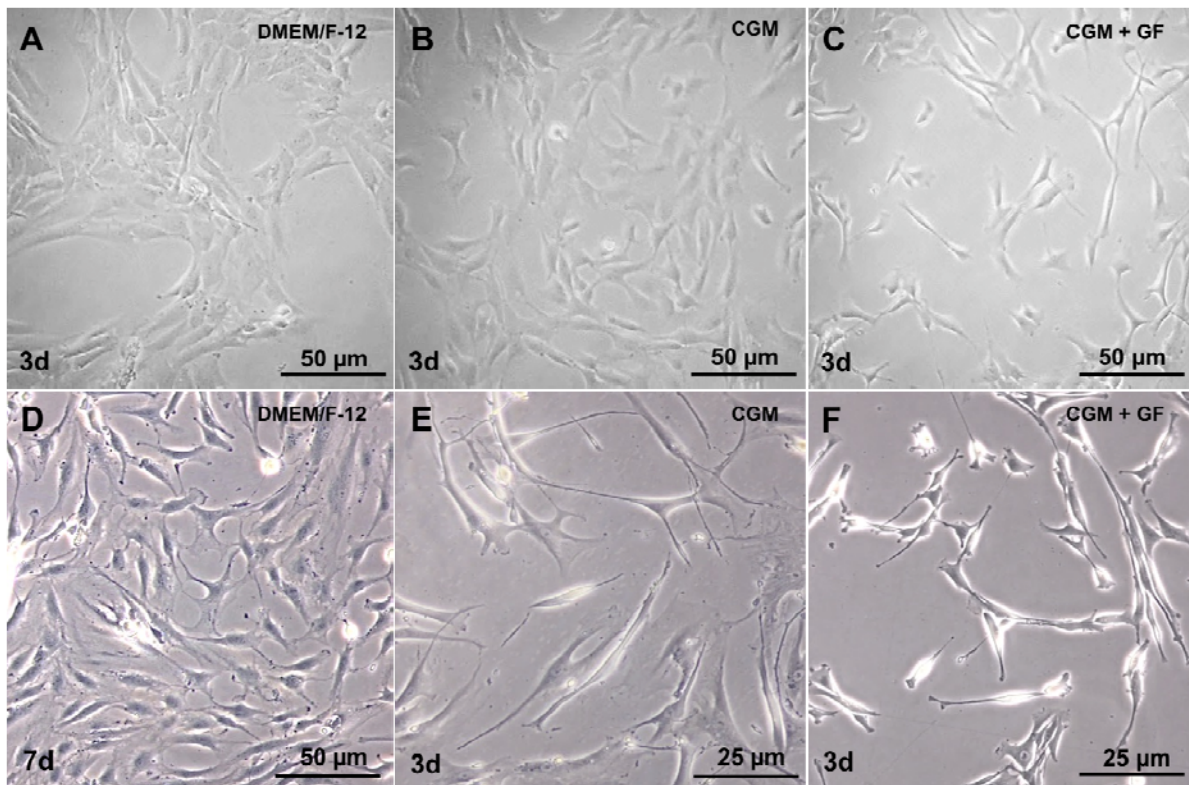
Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Knorpelgewebekonstruktion auf der RPM aus kryogen konservierten Knorpelzellen von sechs Spendern ohne Zusatz von Trägermaterialien (scaffolds), beziehungsweise anderen künstlichen Materialien untersucht. Zu diesem Zweck wurden humane Chondrozyten für 7, 14, 21 und 28 d in drei verschiedenen Medien auf der RPM kultiviert. Nach jedem Zeitpunkt wurde die Sphäroidbildung makroskopisch und mikroskopisch untersucht sowie histologisch und immunhistochemisch analysiert, um die Menge und Verteilung von knorpelspezifischen Gewebekomponenten zu bestimmen.

#### 3.3.3.1 Morphologie der Chondrozyten

Die Morphologie der Chondrozyten war sehr stark vom Kultivierungsmedium abhängig. Wenn die Zellen mit DMEM/F-12 Medium oder mit Chondrozyten-Wachstumsmedium (CGM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert wurden, waren die Zellen sphärisch, langsam proliferierend und bildeten Kolonien (Abb. 32A und 32B). Durch die Zugabe von 5 % FCS, 5 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 20 ng/ml R3-IGF-1, und 0,5 ng/ml VEGF zum CGM erschienen sie spindelförmig und bildeten längliche Zytopenia (Abb. 32C).



Bereits nach viermaliger Subkultivierung zeigten die in DMEM/F-12-Medium und CGM kultivierten Zellen eine abnormale Morphologie: Sie erschienen dedifferenziert, sternförmig mit einem vakuolisierten Zytoplasma (Abb. 32D und 32E). Die Zugabe von Wachstumsfaktoren zum CGM wirkte zellprotektiv (Abb. 32F). Es waren keine Dedifferenzierungsmerkmale sichtbar: Selbst nach vier Subkultivierungsrunden hatten die Zellen ihre Form nicht verändert und erschienen länglich (Abb. 32F).

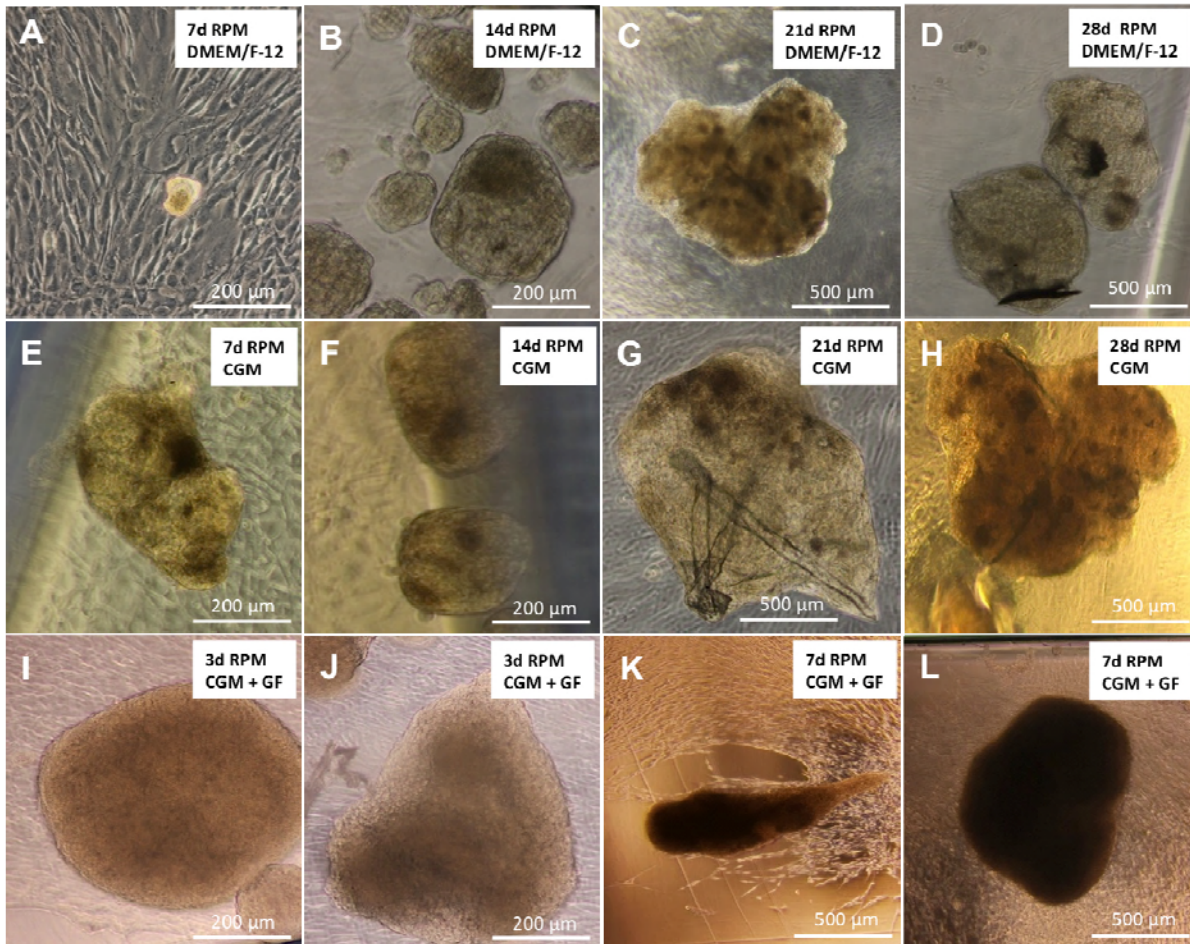


**Abbildung 32: Morphologische Unterschiede der Chondrozyten**

Chondrozyten der 1. Passage (A-C) und der 4. Passage (D-F) kultiviert in DMEM/F-12 (A, D), CGM (B, E) und CGM + Wachstumsfaktoren (C, F). Die Pfeile deuten auf dedifferenzierte, sternförmige Zellen.

### 3.3.3.2 Größe der auf der RRM gebildeten Sphäroide

Die im DMEM/F-12 Medium kultivierten Sphäroide nahmen mit längerer Kultivierungszeit in der Größe zu und erreichten am 28. Tag eine Größe von ca. 1 mm im Durchmesser (Abb. 33D). Bei der Verwendung von CGM wurde die Sphäroidbildung bereits am 4. Tag beobachtet. Nach 28 Tagen hatten die Sphäroide eine Größe von etwa 2 mm im Durchmesser erreicht (Abb. 33H). Durch den Zusatz von 5 % FCS und 5 ng / ml EGF, 10 ng / ml bFGF, 20 ng / ml R3-IGF-1 und 0,5 ng / ml VEGF zum CGM wurden 500 µm-große Sphäroide bereits am 3. Tag beobachtet (Abb. 33I und 33J). Am 7. Tag waren sie bereits 1 mm groß (Abb. 33K und 33L).



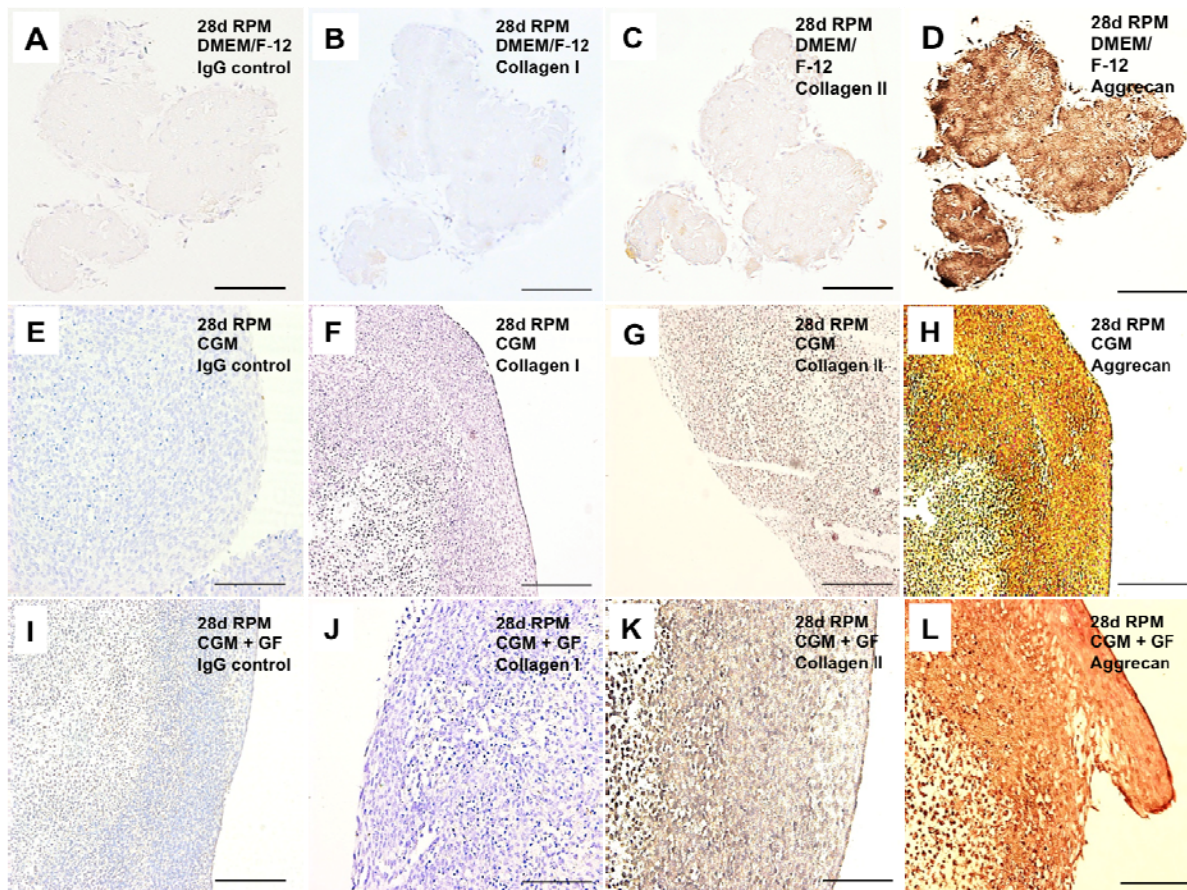
**Abbildung 33: Mikroskopische Analyse der auf der RPM produzierten Sphäroide**

Sphäroide produziert nach 7 Tagen (A, E), 14 Tage (B, F), 21 Tagen (C, G), und 28 Tagen (D, H) im DMEM/F-12 Medium (A-D) und CGM (E-H); Sphäroide produziert nach 3 Tagen (I, J) und 7 Tagen (K, L) in CGM mit Zugabe von Wachstumsfaktoren (GF).

### 3.3.3.3 Immunhistochemische Analyse der Sphäroide

Der vorherrschende Kollagen-Typ in den Sphäroiden, die nach 28 Kultivierungstagen auf der RPM oder in der RWV gebildet wurden, war Kollagen Typ II (Abb. 34). Das Knorpelgewebe war immunhistochemisch Kollagen Typ I-negativ, es zeigte sich eine Reduktion des Kollagen Typ I Proteins, eine starke positive Färbung für Kollagen Typ II und ein erhöhter Proteingehalt von Kollagen Typ II Protein (Abb. 34). Eine positive Färbung für Aggrecan wurde in den gleichen Bereichen wie für Kollagen Typ II beobachtet und analog fand sich auch ein erhöhter Aggrecan-Proteingehalt (Abb. 34). Es lässt sich daher schlussfolgern, dass das auf der RPM bzw. in der RWV produzierte Gewebe dem richtigen hyalinen Knorpel *in vivo* immunhistochemisch sehr ähnlich ist.



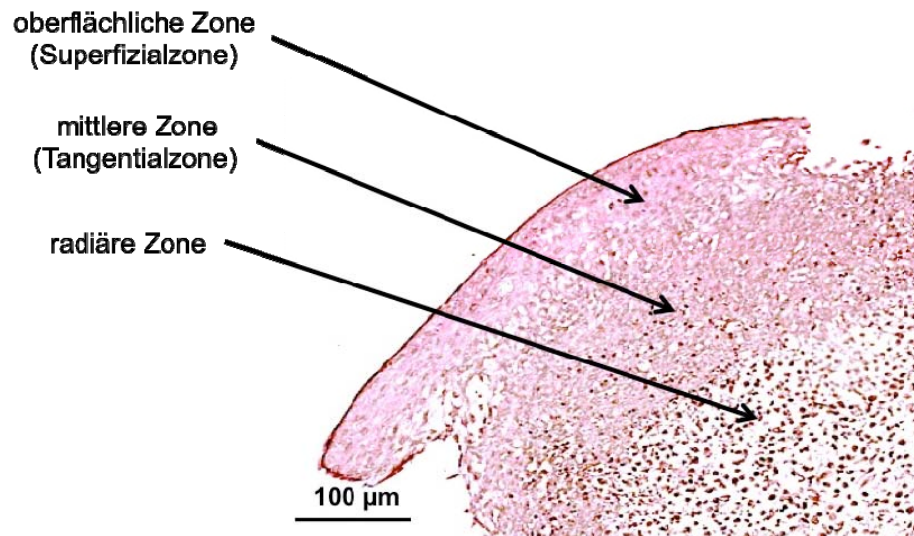


**Abbildung 34: Nachweis der knorpelspezifischen EZM Komponenten in den in der RWV produzierten Sphäroiden**

Negativkontrolle eines 28 Tage alten im DMEM/F-12 Medium (A), CGM (E) und CGM mit Wachstumsfaktoren (CGM+GF, I) gezüchteten Sphäroids. Immunhistochemische Kollagen Typ I Färbung eines 28 Tage- lten im DMEM/F-12 Medium (B), CGM (F) und CGM mit Wachstumsfaktoren (CGM+GF, J) produzierten Sphäroids. Immunhistochemischer Kollagen Typ II Nachweis in einem 28 Tage alten im DMEM/F-12 Medium (C), CGM (G) und CGM mit Wachstumsfaktoren (CGM+GF, K) produzierten Sphäroid. Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Aggrecan des im DMEM/F-12 Medium (D), CGM (H), CGM mit Wachstumsfaktoren (CGM+GF, L) nach 28 Tagen produzierten Sphäroids. Maßstabsbalken – 500 µm.

### 3.3.3.4 Knorpelzonen

Unter Verwendung vom CGM wurde während meiner Versuche auf der RPM eine klare Zonenbildung im nach 28 Tagen produzierten Gewebe mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung beobachtet (Abb. 35, vergl. Abb. 2). Dabei konnten 3 Knorpelzonen identifiziert werden: die oberflächliche Zone, die aus flachen und dünnen Zellen bestand, die mittlere Zone, die aus runden Zellen bestand und die radiäre Zone, die einzelne, in die extrazelluläre Matrix eingebettete Zellen aufwies. Eine mineralisierte Zone (Abb. 2) wurde im produzierten Gewebe nicht beobachtet (Abb. 35).



**Abbildung 35: Zoneneinteilung im auf der RPM produzierten Knorpel**

Hämatoxylin-Eosin Färbung des nach 28 Tagen auf der RPM produzierten knorpelähnlichen Gewebes.

## 4. Diskussion

Forschung an Chondrozyten unter den Bedingungen der realen und simulierten Mikrogravitation hat folgende Zielsetzungen: Zum einen soll das Auftreten von Knorpelschäden bei Astronauten während eines längeren Weltraumaufenthalts besser verstanden werden, um diesen Schäden entgegenzuwirken (Földes et al. 1996). Zum anderen soll dadurch die Knorpelbildung unter Mikrogravitationsbedingungen erforscht werden, denn das produzierte Gewebe kann möglicherweise zukünftig in der plastischen Chirurgie zur Behandlung von Knorpelschäden eingesetzt werden (Stamenkovic et al. 2010, Ulbrich et al. 2010).

Während der vorliegenden Arbeit wurde versucht beiden Zielen nachzugehen. Dafür wurden humane Chondrozyten für kurze Zeit (30 min, 2, 4, 16 und 24 h) und über einen längeren Zeitraum (7, 14, 21 und 28 d) in sogenannten Bodenanlagen (Ground-based Facilities (GBF), Definition der Europäischen Weltraumagentur – European Space Agency, ESA) zur Mikrogravitationssimulation kultiviert und die Zellen bzw. das produzierte Gewebe anschließend im Detail untersucht.

### 4.1 Der Einfluss der Mikrogravitation auf die Chondrozyten

Die Antwort eines jeden Organismus auf die Schwerkraft hängt letztlich von den Funktionen auf zellulärer Ebene ab. Reale und simulierte Mikrogravitation induzieren unterschiedliche Veränderungen im Zytoskelett von menschlichen Zellen wie Schilddrüsenkarzinomzellen (Grimm et al. 2002a, Grimm et al. 2002b), Endothelzellen (Infanger et al. 2006) und Glia-Zellen (Uva et al. 2002). Somit ist es wichtig, die unmittelbare Wirkung der Gravitation auf Zellfunktionen einzelner Zellen bzw. verschiedener Zelllinien zu untersuchen (Grimm et al. 2011, Pietsch et al. 2011).

Das bisherige wissenschaftliche Forschungsgebiet umfasste vor allem die frühen Effekte der Schwerkraft auf Zytoskelett-Veränderungen der Säugerzellen. Da das Zytoskelett an vielen Zellreaktionen beteiligt ist und ihm eine zentrale Rolle bei der Mechanotransduktion zugeschrieben wird, untersuchen viele Gruppen den Einfluss veränderter Gravitationsbedingungen auf seine Struktur. Mittlerweile wird allgemein akzeptiert, dass das Zytoskelett eine bedeutende Rolle bei der zellulären Perzeption von Gravitationsänderungen spielt (Vorselen et al. 2014).

In einer adhären Zelle sind die Mikrotubuli oft radial organisiert. Die aus mehreren Aktin-Filamenten bestehenden Stressfasern sind an der Zellmembran verankert. Dabei wird die Zelle mit ihrer extrazellulären Umgebung durch fokale Adhäsionskomplexe verbunden. Aktin ist am Rand der Zelle lokalisiert und die Intermediärfilamente formen ein lockeres Netzwerk (Vorselen et al. 2014).

Es ist außerdem bereits bekannt, dass menschliche Zellen unter simulierter und realer Mikrogravitation ihre Morphologie, Physiologie und metabolische Aktivität ändern (Cerwinka et al. 2012, Marlovits et al. 2003a). Um diese Veränderungen besser zu erforschen, wurden während dieser Doktorarbeit humane Chondrozyten sowohl unter simulierten Mikrogravitationsbedingungen auf der RPM und dem FRC als auch unter realen Mikrogravitationsbedingungen während eines Parabelfluges untersucht und mit entsprechenden 1g-Kontrollproben verglichen.



#### 4.1.1 Der Einfluss der simulierten Mikrogravitation auf die Chondrozyten

Eine Verringerung der Breite und der Anzahl von Stressfasern (Carlsson et al. 2003, Gershovich et al. 2009, Huang et al. 2009, Li et al. 2009, Meyers et al. 2005;), erweiterte Pseudopodien (Carlsson et al. 2003, Pache et al. 2010, Rösner et al. 2006), eine perinukleäre Verteilung von Zytoskelettbestandteilen (Carlsson et al. 2003, Grenon et al. 2013, Pache et al. 2010) sowie deren verringerte Dichte (Buravkova and Romanov 2001, Moes et al. 2011, Pache et al. 2010) wurden unter simulierten Mikrogravitationsbedingungen bei einer Vielzahl von humanen Zellen beobachtet. Während dieser Doktorarbeit wurden nun zum ersten Mal die Kurzzeit-Effekte der simulierten Mikrogravitation auf humane Chondrozyten nach 30 min, 2 h, 4 h, 16 h und 24 h der RPM- und FRC-Exposition untersucht (Kap. 3.1).

Wie im Kapitel 1.1.1.1 bereits beschrieben, besteht das Zytoskelett der Chondrozyten aus Mikrofilamenten (Aktin), Mikrotubuli (Tubulin) und Intermediärfilamenten (Vimentin, Zytokeratin) (Benjamin et al. 1994). Bereits nach einer 30-minütigen Inkubation unter simulierter Mikrogravitation haben humane Chondrozyten ihre Morphologie geändert, ihre Zytoskelett-Bestandteile neu organisiert und ihre Genexpression verändert. Diese Veränderungen führten später zu einer dreidimensionalen Zell-Zell-Aggregation (Kap. 3.1.1, Kap. 3.1.2). Es zeigte sich, dass die Chondrozyten auf den veränderten Schwerkrafteinfluss bei ihrer Exposition auf der RPM und auf dem FRC ähnlich reagierten. Bereits nach zweistündiger RPM- oder Klinostat-Exposition wurden Löcher im Vimentin-Netz und perinukleäre Ansammlungen von Vimentin beobachtet (Abb. 9B4, Abb. 14E; Tab. 1).

Die bemerkenswertesten Veränderungen waren nach 4 h nachweisbar (Abb. 9, Abb. 14). Zu diesem Zeitpunkt hat die Akkumulation von perinukleärem beta-Tubulin, welches entscheidend für viele grundlegende Prozesse wie Zellbeweglichkeit und Teilung ist (Blain 2009), ihr Maximum erreicht (Abb. 9C2). Außerdem wurden Veränderungen der für Signaltransduktionsprozesse wichtigen (Blain 2009) Vimentin Mikrofilamente beobachtet (Abb. 9C4, Abb. 14F). Uva et al. hatten bereits ähnliche Veränderungen im Zytoskelett der Gliazellen (C (6) Zelllinie) nach 15-minütiger, 30-minütiger, 1-, 20- und 32-stündiger Exposition unter simulierter Schwerelosigkeit auf der RPM gezeigt. Nach 24-stündiger Inkubation humaner Chondrozyten auf der RPM konnten während dieser Arbeit keine sichtbaren Veränderungen im Zytoskelett detektiert werden (Abb. 9D1-D4). Dies zeigt die Fähigkeit der Chondrozyten sich an die Umgebung anzupassen. Solche Anpassungsphänomene wurden auch in Gliazellen nach 32-stündiger Inkubation unter simulierter Mikrogravitation auf der RPM beobachtet (Uva et al. 2002).

Es konnten jedoch in den Zellen auf dem FRC keine Löcher mehr im Vimentin-Netzwerk nach 4 h, 16 h und 24 h beobachtet werden (Abb. 14F, 14G und 14H), was auf einen Unterschied in der Anpassung der Zellen an die Exposition gegenüber dem FRC oder der RPM hinweist, oder auch durch die verschiedenen physikalischen Prinzipien der beiden Anlagen verursacht werden kann (Warnke et al. 2014).

Wie durch die F-Aktin-Färbung gezeigt, wurde die Form der auf der RPM und auf dem FRC kultivierten Chondrozyten verändert: Kortikal lokalisierte Stressfasern wurden nach der vierstündigen Exposition im Vergleich zu den 1g-Kontrollproben sichtbar (Abb. 10C2, Abb. 15B, Tab. 1). Im Vergleich zu den Kontrollzellen wurden die Fasern in ihrer Länge und Dicke bei weiterer Inkubation bis 24 h reduziert (Tab. 1). In den statischen 1g-Kontrollproben hingegen konnten keine Stressfasern beobachtet werden.

Neben dem Zytoskelett weist auch die EZM unter simulierter Mikrogravitation Veränderungen auf. So konnte beispielsweise in Endothelzellen ein Anstieg der Proteinmenge von Laminin und Fibronectin nach 24-stündiger simulierter Mikrogravitation (RPM) beobachtet werden (Ulbrich et al. 2008). Der Anstieg von Kollagen Typ I, Kollagen Typ III und Chondroitinsulfat wurde in Schilddrüsenkarzinomzellen nach einem Tag RPM-Exposition beobachtet (Grimm et al. 2002, Infanger et al. 2006, Kossmehl et al. 2002). Im Gegensatz dazu zeigten Osteoblasten nach 2,5 h während eines Weltraumfluges eine Reduktion von Fibronectin sowohl in der Protein- als auch in der mRNA-Menge im Vergleich zu Bodenkontrollen. Nach 27,5 h bestanden keine signifikanten Unterschiede mehr (Hughes-Fulford 1999). Die Änderungen der EZM-Proteine scheinen daher zellspezifisch zu sein.

Darüber hinaus wurden während dieser Arbeit Veränderungen in der Genexpression von *ACTA2*, *ACTB*, *VIM*, *TUBB6*, *ITGB1* und *TGFBI* in Form von einer Hochregulation nach nur 30-minütiger Inkubation auf der RPM festgestellt (Abb. 13). Interessanterweise zeigten *BMP2* und *OPN* Gene einen extrem hohen Expressionsspiegel nach 4 h in den unter normalen Gravitationsbedingungen kultivierten Kontrollproben (1g) (Abb. 13H, 13L). Es wurde außerdem ein hoher Proteingehalt an BMP-2 Protein nach der Inkubation für 4 h auf der RPM beobachtet (Abb. 13I). Um die Ursache dieser Hochregulation zu untersuchen, sind weitere Versuche notwendig. Jedoch wird BMP-2, ein Mitglied der TGF- $\beta$ -Familie, als Stimulans der Chondrogenese betrachtet, die nur selten im gesunden Knorpel auftritt (Blaney et al. 2007, Pogue und Lyons 2006, Shu et al. 2011).

Nach 24-stündiger Inkubation menschlicher Chondrozyten auf der RPM wurde eine vermehrte Expression des *TGF- $\beta_1$* -Gens sowie die erhöhte Produktion vom TGF- $\beta_1$ -Protein beobachtet (Abb. 13N-P). Während der Versuche mit Schilddrüsenkarzinomzellen auf der RPM wurde ebenfalls ein Anstieg im Gehalt des TGF- $\beta_1$ -Proteins beobachtet (Infanger et al. 2006).

Zusätzlich wurde in humanen Endothelzellen nach 4 h und 24 h eine erhöhte TGF- $\beta_1$ -Sekretion im Überstand und ein signifikanter Anstieg des Gehalts an EZM-Proteinen nach 48 h RPM-Exposition gemessen (Grimm et al. 2010). TGF- $\beta_1$  ist für seine Beteiligung an der Zellausbreitung und der Migration der Schilddrüsenzellen bekannt (Pogue und Lyons 2006). Es induziert auch die Bildung eines dichten Zell-Monolayers (Pogue und Lyons 2006) und erhöht die Produktion verschiedener Strukturproteine (Kawata et al. 1991, ten Dijke und Hill 2004). Daher wird diskutiert, dass dieses Protein als sogenannter Gravisensor agiert, also eine Schlüsselrolle in der Erfassung der

Mikrogravitation spielt und die EZM-Produktion in Chondrozyten-Zellen, sowie in den Endothel- und Schilddrüsenkarzinomzellen triggert (Ernst et al. 1995, Ulbrich et al. 2010).

#### 4.1.2 Der Einfluss der Kurzzeit-Mikrogravitation auf die Chondrozyten

Unter realer Mikrogravitation verlieren die Mikrotubuli ihre radiale Organisation, sind verkürzt und können gekrümmt oder gebogen sein. Sie sind vermehrt perinukleär lokalisiert. Die Aktin-Stressfasern sind in ihrer Anzahl, Dicke und Länge reduziert (Vorselen et al. 2014). Aktin hat vorzugsweise eine perinukleäre oder kortikale Lokalisation im Vergleich zu den Ig-Kontrollproben. Fokale Adhäsionsproteine liegen nicht mehr geordnet vor, sondern erscheinen als große Bündel ohne radiale Orientierung in der kortikalen Schicht, was zu einer geringeren Zellausbreitung führt. Intermediärfilamente formen im Netzwerk Bündel und größere Maschen mit perinukleärer Organisation (Vorselen et al. 2014).

Die ersten Zytoskelett-Veränderungen des Aktins im Weltraum wurden von Rijken et al. (1991) im Rahmen von Experimenten mit A431-Zellen auf einer Höhenforschungsrakete beobachtet. Dabei wurden eine höhere Dichte des filamentösen Aktins und eine verringerte Stressfaserorganisation festgestellt (Rijken et al. 1991). Weitere Untersuchungen auf der Höhenforschungsrakete ergaben, dass die Menge von F-Aktin in A431 Epidermoidkarzinomzellen nach 7 min unter realer Mikrogravitation erhöht wurde (Boonstra 1999), was zu der Schlussfolgerung führte, dass das Aktin-Mikrofilamentsystem empfindlich auf die Veränderungen der Schwerkraft reagiert und durch den Umbau der Aktin-Mikrofilamente die Signalübertragung beeinflussen kann (Boonstra 1999). Anschließend zeigten weitere Wissenschaftler, dass Aktin in verschiedenen Zelltypen wie Osteoblasten, Monozyten oder Endothelzellen, die unter realer Mikrogravitation kultiviert wurden, verändert ist (Hughes-Fulford 1996, Grimm et al. 2011).

Schilddrüsenkarzinomzellen wurden bereits während eines Parabelfluges untersucht. Es wurden Stressfasern im Aktin-Netzwerk nach 22 s Mikrogravitation beobachtet und *ACTB* mRNA nach der ersten und 31. Parabel signifikant hochreguliert (Ulbrich et al. 2011).

Die bereits beobachteten Veränderungen nach der ersten Parabel in niedrig-differenzierten follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen der ML-1 Zelllinie (Ulbrich et al. 2011) konnten während dieser Arbeit an Chondrozyten bestätigt werden: Es wurden Änderungen im F-Aktin-Netzwerk in Form von einer perinukleären Akkumulation und die Ausbildung Membran-assoziiierter Aggregate festgestellt. Weiterhin war die *ACTB* Genexpression signifikant nach der ersten und 31. Parabel erhöht, allerdings wurden keine Stressfasern im Aktin-Netzwerk während des Parabelfluges beobachtet (Abb. 17A2, 17A4).

Deutliche Strukturveränderungen der Mikrotubuli konnten in der realen Mikrogravitation bei Jurkat-Zellen beobachtet werden (Lewis et al. 1998). Im Rahmen einer Space Shuttle Mission hatten innerhalb von 4 h die Mikrotubuli von Lymphozyten ihre radiale Struktur verloren. Sie waren außerdem verkürzt (Lewis et al. 1998). Während einer Studie auf einer Höhenforschungsrakete (12

min Mikrogravitation) wurden große Bündel und Aggregate im Vimentin-Netzwerk beobachtet (Sciola et al. 1999). In einer anderen Studie, traten Veränderungen im Zytokeratin-Netzwerk erst nach 48 h Mikrogravitation auf. Ein möglicher Grund dafür könnte an der Selbstorganisation der Mikrotubuli liegen, die durch Gravitation bestimmt wird und in Mikrogravitation nicht erfolgt (Glade 2006, Papaseit 2000, Tabony 2007).

Während dieser Arbeit wurden moderate Veränderungen der Struktur des Zytoskeletts (Tubulin, Vimentin und Zytokeratin) mittels Immunfluoreszenzfärbungen erst nach 31 Parabeln und nicht nach der ersten Parabel festgestellt (Kap. 3.2.1, Abb. 16). Dieser Befund steht im Gegensatz zu menschlichen Endothelzellen oder niedrig-differenzierten follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen, die während einiger Parabelflug-Missionen untersucht worden waren. Dort fanden sich bereits nach der ersten Parabel deutliche Zytoskelett-Veränderungen (Grimm et al. 2011, Ulbrich et al. 2011, Wehland et al. 2013). Das Zytoskelett der Chondrozyten scheint somit im Vergleich zu dem der Endothelzellen (Grosse et al. 2012) oder der Schilddrüsenkarzinomzellen (Ulbrich et al. 2011) stabiler zu sein. Löcher im Mikrotubuli-Netzwerk wurden ebenfalls nach 31 Parabeln beobachtet, was darauf hinweist, dass die Zytoskelett-Komponenten wie Tubulin, Vimentin und Zytokeratin unter realen Mikrogravitationsbedingungen neu organisiert werden, was nachfolgend zum Zelltod (Matsuoka et al. 1995, Lewis 2002) oder auch zu einem ersten Signal für die Gewebebildung (Grosse et al. 2012) führen kann.

Das Ausmass der Zytoskelett-Veränderungen kann durch die Verwendung eines geeigneten Kultivierungsmediums, hier des Chondrozyten-Wachstumsmediums offensichtlich beeinflusst werden. Das Medium, dessen Zusammensetzung vom Hersteller einer Geheimhaltung unterliegt, kann Wachstumsfaktoren enthalten, die Zellen von externen Belastungen wie beispielsweise der Mikrogravitation schützen. Eine derartige Schutzwirkung der Wachstumsfaktoren auf Endothelzellen wurde bereits in früheren Untersuchungen beobachtet (Grimm et al. 2010, Pietsch et al. 2011, Ulbrich et al. 2008). Dies lässt nun schlussfolgern, dass die Knorpelgewebebildung durch Verwendung eines optimalen Mediums verbessert werden kann. Darüber hinaus könnten dadurch mikrogravitationsabhängige Knorpelerkrankungen und -veränderungen reduziert oder verhindert werden, wenn Astronauten entsprechend vor oder während eines Weltraumfluges ernährt werden. Die Ernährung/Zusammensetzung der Nahrung der Astronauten ist aktuell ein wichtiges Forschungsgebiet der NASA. Dazu sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich, um die Proteine, die für die Schutzwirkung verantwortlich sind, zu finden und die beteiligten Mechanismen zu erforschen.

Neben Änderungen in der Zellform konnten Veränderungen in der Genexpression und dem Proteingehalt von Tubulin, Vimentin und Zytokeratin in Form von einer Hochregulation im Vergleich zu den entsprechenden Bodenkontrollen beobachtet werden (Abb. 18). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Veränderungen im Zytoskelett der auf der RPM kultivierten humanen Chondrozyten, wo eine erhöhte Genexpression von *ACTA2*, *ACTB*, *TUBB6* Genen bereits nach 30-

minütiger Inkubation beobachtet wurde (Abb. 13). Die erhöhte Genexpression resultierte in einem erhöhten Proteingehalt. So wurde die *VIM* mRNA auf der RPM nach 30 min leicht hochreguliert (Abb. 13C). Diese Hochregulation hat allerdings den Proteingehalt während der folgenden 4 h RPM-Exposition nicht beeinflusst (Abb. 13D).

Darüber hinaus wurde die mRNA verschiedener Membrankomponenten wie  $\beta_1$ -Integrin, ICAM-1, Osteopontin, und Caveolin-1 der Chondrozyten nach 31 Parabeln gemessen und mit den 1g-Kontrollproben verglichen (Kap. 3.2.2, Abb. 19, 20). Es wurde eine Überexpression von *OPN*, *ITGA10*, *ITGB1*, *ICAM1* und *CAV-1* festgestellt (Abb. 19A6, 19A7, 20A2, 20B, 20C1). Integrine bestehen aus zwei Untereinheiten ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit) und sind an der Adhäsion von Zellen an die Proteine der EZM beteiligt (Legate et al. 2009). In Chondrozyten ist die  $\beta_1$ -Untereinheit die wichtigste  $\beta$ -Untereinheit der Integrine. Sie bildet Dimere mit verschiedenen  $\alpha$ -Einheiten und regelt damit die Bindung an Laminin und Kollagen-Rezeptoren (Michigami 2013). Osteopontin und ICAM-1 sind Marker für die Dedifferenzierung von Chondrozyten (Schnabel et al. 2002). ICAM-1 ist nicht im gesunden Knorpelgewebe vorzufinden, kann aber bei der Interaktion von Chondrozyten und umgebenden Proteinen nachgewiesen werden (Pitzke et al. 1994). Eine deutliche Änderung der EZM - Chondrozyten-Interaktion kann außerdem ein Frühindikator für die spätere gerüstfreie Bildung vom Knorpelgewebe sein (Ulbrich et al. 2010). Die Hochregulierung von *CAV-1* scheint hauptsächlich durch die Exposition der Zellen mit der realen Mikrogravitation zustande zu kommen, die Mikrogravitation als Stress empfinden können (Wang et al. 2011).

Darüber hinaus wurden die *BMP-2*, *TGFBI*, *SOX5*, *SOX6* und *SOX9* mRNAs und Proteine während des Parabelflugs verändert (Abb. 20D1, 20E1, 20F, 20G, 20H). Diese regulieren die Chondrozytenentwicklung über eine komplexe wechselseitige Reaktion (Gao et al. 2013), denn TGFBI, SOX9 zusammen mit BMP-2 sind an der Entwicklung der Chondrozyten aus den mesenchymalen Stammzellen beteiligt (Weber et al. 2013). Dieser Prozess wird anscheinend nach 31 Parabeln gefördert, da die *BMP-2*, *TGFBI* und *SOX9* mRNAs hochreguliert werden sowie deren Proteingehalt erhöht wird (Abb. 20). Interessanterweise werden SOX5 und SOX6 während des Parabelfluges herunterreguliert (Abb. 20F, 20G). In der Literatur wird eine Ko-Regulation des SOX-Trios beschrieben, wobei die Herunterregulation von SOX5 und SOX6 von SOX9 nicht beeinflusst wird, wenn Fibulin-3, ein wichtiger Bestandteil der EZM, in den Chondrozyten überexprimiert wird (Wakabayashi et al. 2010).

Während einer weiteren Studie zur Untersuchung des Einflusses der realen Mikrogravitation auf humane Chondrozyten wurden Mikroarray-Analysen durchgeführt, die zeigten, dass nach nur einer Parabel relativ unspezifische Effekte auf die Zellen wirken. Im Wesentlichen sind die beeinflussten Gene an der Transkription beteiligt (Wehland und Aleshcheva et al. 2015). Dies ist ein Indiz dafür, dass die Zellen die Veränderungen der Gravitation wahrgenommen und ihre Transkriptionsvorrichtung umstrukturiert haben, was in einer veränderten Genexpression zu sehen war. Nach 31 Parabeln wurde eine vermehrte Expression der anti-apoptotischen Gene beobachtet. Die qPCR-

Analyse spiegelte die gleiche Tendenz wieder (Abb. 22). Die meisten der untersuchten Gene (CD44, IL6, EDN1, TNFA und FGF9) zeigten nur intermediäre oder keine Veränderungen (Abb. 22). Dies scheint die Annahme zu bestätigen, dass die Zellen in der Lage sind, den kurzzeitigen Stress sehr schnell zu überwinden. Nur die Expression von *CCNA2*, einem am Zellzyklus und an der Proliferation beteiligten Gen (Blanchard 2000), und des anti-apoptotischen *IL8* Gens (Abdollahi et al. 2005), die interessanterweise auch eine wachstumsfördernde Wirkung haben, waren signifikant erhöht (Abb. 22A, 22D). Dabei ist zu beachten, dass diese Veränderungen durch kurzfristige Mikrogravitation hervorgerufen wurden und durch längere Exposition bestätigt werden sollten. RPM-Versuche haben zu einer erhöhten Expression von mehreren Genen, die für die Zellmotilität, Struktur und Integrität, Kontrolle von Zellwachstum, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose verantwortlich sind, geführt (Aleshcheva et al. 2013). Diese Ergebnisse sind auch in guter Übereinstimmung mit früheren Studien, die ebenfalls berichteten, dass die Chondrozyten sich unter realen Mikrogravitationsbedingungen sehr robust verhalten (Duke et al. 1993).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Knorpelzellen empfindlich auf die reale Mikrogravitation beim Parabellflug reagieren. Kontrollexperimente im Hinblick auf parabellflugspezifische Beschleunigungen (Hypergravitation) und Vibrationen identifizieren die mikrogravitationsspezifischen Veränderungen. Eine relativ kurze Mikrogravitationsphase von 31 Parabeln reicht aus, um Veränderungen am Zytoskelett zu induzieren. Ferner zeigten sich Änderungen der Genexpression. Das Wissen über diese frühen durch die reale Mikrogravitation induzierten Veränderungen sowie nachfolgender Anpassungsmechanismen ist für die Vorbereitung zukünftiger Raumflüge und bemannter Missionen zur ISS oder zur zukünftigen chinesischen Raumstation von großer Bedeutung (Ma et al. 2014, Pietsch et al. 2013).

#### **4.1.3 Der Einfluss der Hypergravitation und Vibration auf Chondrozyten**

Da die reale Mikrogravitation während eines Parabellfluges von Hypergravitation und Vibration begleitet wird, wurde deren Einfluss auf humane Chondrozyten während dieser Doktorarbeit ebenfalls untersucht (Kap. 3.2.3).

Die Chondrozyten wurden für 2 h der Hypergravitation (1,8g) ausgesetzt. Die Microarray-Analyse ergab, dass nur eine sehr moderate Anzahl an Genen verändert war (Wehland und Aleshcheva et al. 2015). Es ist interessant zu vermerken, dass in erster Linie biologische Prozesse betroffen waren, die an der Gewebebildung oder der Skelettentwicklung beteiligt sind. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Hypergravitation eine unmittelbare Wirkung auf die Knorpelentwicklung hat.

Eine mechanische Belastung induziert außerdem die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors A (VEGF-A) (Beckmann et al. 2014). VEGF-A gehört zu einer Familie von Wachstumsfaktoren bestehend aus VEGF-A, -B, -C, -D, -E und Plazenta-Wachstumsfaktor (PGF) und ist eine der wichtigsten Komponenten, die die Angiogenese steuern und an der Entwicklung

neuer Gefäße beteiligt sind (Ferrara 2001, Ferrara et al. 2003). VEGF wird überwiegend im kranken, osteoarthritischen Knorpel bzw. Chondrozyten gefunden und trägt weiter zur Knorpeldesintegration durch die Anregung der Matrixmetalloproteinase bei, die die extrazelluläre Matrix abbauen (Pufe et al. 2004, Pufe et al. 2005). Während dieser Arbeit wurde eine um den Faktor 1,65 erhöhte Genexpression von VEGFA in der Hypergravitation gefunden, wobei *MMP3* und *MMP10* Transkripte unter Hypergravitation herunterreguliert waren. Es wird nun vermutet, dass dies auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass die Knorpelzellen einen Monolayer in den Kulturflaschen bilden und nicht in eine EZM-ähnliche Matrix eingebettet sind, was in ihrer physiologischen Umgebung der Fall ist. Die verminderte MMP-Genexpression sowie die erhöhte VEGFA-Genexpression könnten darauf hindeuten, dass die Zellen während längerer Inkubationszeit vermehrt EZM bilden werden.

Das *BMP4* Gen wurde ebenfalls in Hypergravitation vermindert exprimiert. BMP-4 stimuliert die Synthese von Kollagen Typ II und Aggrecan und beschleunigt so die Bildung von Gelenkknorpel (Steinert et al. 2003, Reddi 2001).

Auch das *EDN1* (Endothelin-1) Gen wurde herunterreguliert. Es wurde berichtet, dass die Überexpression von Endothelin-1 mit Knorpeldegeneration verbunden ist (Yuan et al. 2013). Im Gegensatz dazu wurde der Inhibitor der Apoptose *BIRC3* (Saleem et al. 2013) hochreguliert, was auf ein verbessertes Überleben der Zelle hindeutet. Darüber hinaus wurde die Genexpression von *WNT5A* verringert. Wnt-5a ist für seine Beteiligung am Knorpelabbau durch Hochregulation von MMPs bekannt (Hosseini-Farahabadi et al. 2013). Es ist daher klar, dass Chondrozyten auf die durch Hypergravitation hervorgerufene mechanische Beanspruchung empfindlich reagieren, wobei bislang noch keine definitive Antwort über die Art der Wirkung gegeben werden kann.

Im Gegensatz zur Hypergravitation waren die Auswirkungen der Vibrationen auf die Chondrozyten um einiges deutlicher (Abb. 24). Im Versuchsaufbau haben die Vibrationen, die in die Kulturflaschen durch das Medium übertragen wurden, zusätzliche Scherkräfte hervorgerufen. Die Scherkräfte haben einen negativen Einfluss auf Chondrozyten und Knorpel (Smith et al. 2000, Smith et al. 2004). Es wurde berichtet, dass Chondrozyten, die Scherkräften ausgesetzt sind, erhöhte Mengen an proinflammatorischen Interleukinen (IL-6 oder IL-8) produzieren (Ryu et al. 2011, Zhang et al. 2014). Dies wurde durch die starke Expression dieser Gene während der qPCR-Analyse bestätigt, wenn auch keine Erhöhung der IL-6-Sekretion und Abnahmen in *EGF*, *VEGFD* und *FGF17* Genexpression beobachtet werden konnten (Kap. 3.2.3, Abb. 24). Die Anwesenheit dieser Faktoren ist für die Knorpelentwicklung von besonderer Bedeutung (Civinini et al. 2013, Krejci et al. 2007). Diese Ergebnisse haben somit gezeigt, dass die Vibrationen die Chondrozyten in Richtung eines entzündlichen, den Knorpel destabilisierenden Zustandes führen.

## 4.2 Tissue Engineering des Knorpels

Es ist bekannt, dass die Mikrogravitation humane Zellen zur Sphäroidbildung bzw. zum 3D Wachstum anregt (Cerwinka et al. 2012). Die RWV als rotierender Bioreaktor bietet viele Vorteile für die Zellen, laut Entwickler, eine minimale Scherbeanspruchung aufgrund der geringen Scherkraft, sowie fast keine hydrodynamische und sehr geringe mechanische Scherung, weil dadurch geringe Wechselwirkungen mit anderen Zellen auftreten. Dies ermöglicht eine sehr gute Stoffübertragung ohne Rühren, eine effiziente Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Die RWV erlaubt es mechanische Einstellungen zu ändern, um die Sphäroidbildung und die Zellproliferation im dreidimensionalen Sphäroid zu fördern (Jakob et al. 2001, Obradovic et al. 1999).

Diese Eigenschaften haben eine Reihe von Ähnlichkeiten mit Mikrogravitation, was den Bioreaktor zu einem guten Modell für die Untersuchungen von Mikrogravitationseffekten auf Zellen, und zu einem Werkzeug für die 3D Kultivierung macht. Es ist außerdem wohl bekannt, dass die Mikrogravitation die Zellen zur Sphäroidbildung bzw. zum 3D Wachstum anregt (Cerwinka et al. 2012).

Tissue Engineering unter simulierten und realen Mikrogravitationsbedingungen ist derzeit ein wichtiges Thema in der Weltraummedizin (Grimm et al. 2014, Ulbrich et al. 2014), dessen Fortschritte und Leistungen während dieser Doktorarbeit kritisch betrachtet und dargelegt wurden. Dabei wurden die aktuellen Kenntnisse in Bezug auf das Tissue Engineering von Knorpel (Grimm et al. 2014) als auch die Gewebeproduktion aus Knochenzellen oder mesenchymalen Stammzellen erörtert, da die Chondrozyten ihren Ursprung aus mesenchymalen Stammzellen nehmen (Ulbrich et al. 2014). Das Verständnis der Biologie der dreidimensionalen (3D) Strukturen ist für eine vollständige Würdigung der *in vivo* Gewebekonstruktionsverfahren sehr wichtig.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Zellen in der realer Mikrogravitation im Weltraum oder in simulierter Mikrogravitation dreidimensionale Gewebe bilden können (Grimm et al. 2014, Ulbrich et al. 2014). Diese innovativen Methoden stellen eine neue Strategie für das Tissue Engineering einer Vielzahl von Geweben dar. Die Verwendung der Bodenanlagen erlaubt den Zellen 3D Strukturen im Medium zu bilden, die leicht für jegliche Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden können. Diese Sphäroide (Intima-Konstrukte, multizelluläre Tumorsphäroide) werden zum Studium der molekularen Mechanismen der Angiogenese und Krebsentstehung verwendet, sowie zur Prüfung der pharmakologischen Anwendung von Chemotherapeutika oder Inhibitoren der Neoangiogenese (Grimm et al. 2014, Ulbrich et al. 2014). Außerdem sind sie für toxikologische oder strahlenbiologische Untersuchungen einsetzbar, oder zur Durchführung von Kokultur-Experimenten notwendig (Grimm et al. 2014, Ulbrich et al. 2014). Die Zukunft wird zeigen, ob diese Tissue-Engineering-Konstrukte für medizinische Transplantationen eingesetzt werden können.

Die wissenschaftliche Untersuchung der schwerkraftabhängigen Mechanismen und Signalwegen auf molekularer und zellulärer Ebene ist von großer Bedeutung für die Verbesserung der



Raumfahrtmedizin und für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien im Bereich der regenerativen Medizin. Es lassen sich mit diesen neuen Methoden Tierversuche einsparen.

#### **4.2.1 Tissue Engineering des Knorpels in der RWV**

Die RWV ist bisher die einzige Bodenanlage, die für Tissue Engineering Studien verwendet wurde. Außerdem wurde die RWV bereits von mehreren Forschern zur Untersuchung von Epithelzellen (Radtke und Herbst-Kralovetz 2012), Schwann-Zellen (Valmikinathan et al. 2011), Bandscheibenzellen (Yang et al. 2011), Trophoblasten (Zvezdaryk et al. 2012), sowie für das Tissue Engineering mit Leberzellen (Barzegari und Saei 2012, Chang und Hughes-Fulford 2014), Knochenzellen (Ishikawa et al. 2011, Nishi et al. 2013, Song et al. 2013) und elastischem Knorpel (Takebe et al. 2012) verwendet. Das Gewebe, das aus menschlichen Knorpelzellen im RWV Bioreaktor innerhalb von 2 Wochen produziert wurde, zeigte eine morphologische Ähnlichkeit mit dem hyalinen Knorpel, was durch histologische und immunhistologische Färbungen bestätigt werden konnte (Sakai et al. 2009). Die RWV förderte außerdem die chondrogene Differenzierung von adulten menschlichen Knochenmarkzellen (Sakai et al. 2009).

Ähnliche Ergebnisse wurden während einer 12-wöchigen Kultivierung von dedifferenzierten Chondrozyten in der RWV erzielt, in der die Zellen eine spontane Aggregation und Bildung von festem Gewebe zeigten (Marlovits et al. 2003(a)). Die RWV erwies sich als gutes Werkzeug für die Bereitstellung einer Umgebung, in der die dedifferenzierten Knorpelzellen redifferenzierten und eine knorpelspezifische extrazelluläre Matrix bildeten (Marlovits et al. 2003(a)). Auch nach 90 Tagen kontinuierlicher Kultivierung konnte ein dreidimensionales knorpelähnliches Gewebe gebildet werden, das in eine perichondrale Membran eingekapselt wurde (Marlovits et al. 2003(a)). Die morphologischen Untersuchungen zeigten in Clustern geordnete differenzierte Chondrozyten. Diese waren in eine dichte Knorpelmatrix mit starker positiver Reaktion mit monoklonalen Antikörper gegen Kollagen Typ II und Proteoglykan eingebettet (Marlovits et al. 2003(a)). Transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten differenzierte und stark metabolisch aktive Chondrozyten, die eine aus einem feinen Netz von zufällig verteilten quer gebänderten Kollagenfasern bestehende extrazelluläre Matrix produzierten (Marlovits et al. 2003(b)). Diese Ergebnisse konnten während der vorliegenden Doktorarbeit bestätigt werden. Während einer 28-tägigen Kultivierung wurde in der RWV ein 3.5 mm-großes Gewebe produziert, das eine stark positive Reaktion mit monoklonalen Antikörpern gegen Kollagen Typ II und Aggrecan zeigte (Kap. 3.3.2). Allerdings wurde bereits nach 21 Tagen kontinuierlicher Kultivierung in dem produzierten Gewebe mittels Western Blot und dem FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit Apoptose nachgewiesen (Kap. 3.3.2.4, Abb. 29, Abb. 30).

Abgesehen davon, dass die Apoptose ein aktiver Prozess ist, bei dem es zum geregelten Untergang der Zelle (programmierter Zelltod) und der Beseitigung ihrer Reste kommt und der für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase während der Entwicklung von Organismen essentiell ist

(Zuzart-Luis et al. 2002), kommt es dabei zu zahlreichen Zellveränderungen. Es zeigt sich ein Ausstülpfen der Zellmembran („membrane blebbing“). Anschließend wird die DNA durch Nukleasen gespalten und es kommt zur Kondensation des Chromatins. Der Kern zerfällt in Bruchstücke und die Zelle schrumpft. Nach dem Zerfall der Zelle wird sie von den umgebenden Zellen oder Makrophagen phagozytiert und damit aus dem Gewebe entfernt. Dadurch ist ein Langzeit-Tissue Engineering in der RWV fraglich und es kommen nur neu gebildete Sphäroide für die regenerative Medizin infrage.

#### **4.2.2 Tissue Engineering des Knorpels auf der RPM**

Mittels der Random Positioning Machine wird ebenfalls versucht ein dreidimensionales Wachstum auf der Erde zu erreichen. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich Schilddrüsenkarzinomzellen (ML-1) auf der RPM zu Sphäroiden (Grimm et al. 2002) und humane Endothelzellen zu tubulären Strukturen zusammenlagern (Infanger et al. 2004). Knorpelzellen bilden bereits zwischen 5 und 7 Tagen auf der RPM Sphäroide. Es können in den auf der RPM befestigten Kulturflaschen längliche Knorpelgewebestücke beobachtet werden (Ulbrich et al. 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Knorpelgewebbildung der kryogen konservierten Knorpelzellen von sechs Spendern ohne Zusatz von Trägermaterialien (scaffolds), beziehungsweise anderen künstlichen Materialien auf der RPM nach 7 Tagen, 14 Tagen, 21 Tagen und 28 Tagen in drei verschiedenen Medien untersucht (Kap. 3.3.3). Dabei wurde festgestellt, dass einzelne Zellen durch das Medium beeinflusst wurden. Da die Chondrozyten nach mehrmaligem Passagieren dedifferenzieren, ihr Phänotyp sich zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen ändert und überwiegend Typ I-Kollagen produziert wird (Matlovits et al. 2003, Wu et al. 2013), konnte durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren zum Kultivierungsmedium (CGM+GF) der Dedifferenzierungsprozess unterbunden werden (Kap. 3.3.3.1, Abb. 32).

Auch die Gewebbildung wurde durch die Mediauswahl beeinflusst (Abb. 33). Die im DMEM/F-12 Medium kultivierten Sphäroide erreichten am 28. Tag eine Größe von ca. 1 mm im Durchmesser (Abb. 33D). Bei der Verwendung von CGM wurde die Sphäroidbildung bereits am 4. Tag beobachtet. Nach 28 Tagen haben die Sphäroide eine Größe von etwa 2 mm im Durchmesser erreicht (Abb. 33H). Durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren wurden 500 µm große Sphäroide bereits am 3. Tag beobachtet (Abb. 33I und 33J) und am 7. Tag waren sie bereits 1 mm groß (Abb. 33K und 33L).

Außerdem konnte im auf der RPM produzierten Gewebe eine stark positive Reaktion mit monoklonalen Antikörpern gegen Kollagen Typ II und Aggrecan nachgewiesen und unter Verwendung vom CGM eine klare Zonenbildung im Gewebe mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung beobachtet werden (Kap. 3.3.3.4, Abb. 35).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten auch auf der RPM ein knorpelähnliches Gewebe bilden und dass dieser Prozess durch die Mediumauswahl verändert bzw. beschleunigt werden kann.

### 4.3 Perspektiven der Knorpelregeneration in der Mikrogravitation

Das Tissue Engineering des Knorpels in der Mikrogravitation stellt ein viel versprechendes Verfahren zur Knorpelregeneration dar, das viele Vorteile mit sich bringt, auf die in dieser Arbeit eingegangen wurde. So kann Knorpelgewebe aus den patienteneigenen Chondrozyten in relativ kurzer Zeit (bis zu 4 Wochen) hergestellt werden. Die Kultivierungsdauer hängt allerdings von der metabolischen Aktivität der Zellen, die mit steigendem Alter und Gewicht des Patienten abfällt, von der benötigten Gewebegröße bzw. Größe der Defektstelle und vom Kultivierungsmedium ab. Wie in dieser Doktorarbeit gezeigt wurde, konnte die Knorpelproduktion durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren zum Kultivierungsmedium bis zu 3-fach beschleunigt werden. Außerdem können bei der *in vivo* Kultivierung die Betriebsmodi wie z.B. Drehgeschwindigkeit geändert werden, die ebenfalls die Knorpelproduktion beeinflussen können.

Bisher wurde die Knorpelgewebekonstruktion nur in der Rotating Wall Vessel untersucht. Während zahlreicher Versuche über 9-90 Tage mit und ohne Zugabe von Trägermaterialien (scaffolds) konnte ein knorpelähnliches Gewebe produziert werden, das aus differenzierten und metabolisch aktiven Chondrozyten bestand und eine stark positive Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen Aggrecan und Kollagen Typ II zeigte (Akmal et al. 2006, Marlovits et al. 2003a, Marlovits et al. 2003b, Takebe et al. 2012). Während einer Studie für diese Doktorarbeit konnte allerdings die Apoptose in dem auf der RWV produzierten Gewebe bereits nach 21 Kultivierungstagen festgestellt werden. Dies kann für den Patienten nachteilig sein, daher sind kürzere Kultivierungsperioden von Vorteil.

Die RPM-Exposition ist nicht gleich der realen Mikrogravitation. In den unter simulierter Mikrogravitation kultivierten Zellen werden in der Regel Veränderungen beobachtet, die zwischen den Veränderungen in der realen Mikrogravitation, auf der ISS und jenen auf der Erde (1g) vorzufinden sind (Freed et al. 1997). Einige der unter realer Mikrogravitation beobachteten Veränderungen konnten bei Verwendung von Bodenanlagen meistens bestätigt werden (Infanger et al. 2006, Li et al. 2009, Meloni et al. 2006, Rösner et al. 2006, Uva et al. 2002, Yang et al. 2010). Daten von T-Lymphozyten und Schilddrüsenkarzinomzellen haben gezeigt, dass die Bedingungen auf der RPM für die untersuchten Parameter und die Zellsysteme gut mit den Bedingungen von Weltraumflügen übereinstimmen (Ma et al. 2014, Schwarzenberg 1999). Wegen größerer Kultivierungsvolumina und dadurch vermehrter Ausbeute bei relativ leichter Handhabung stellt die RPM die am besten geeignete Bodenanlage zur Knorpelkultivierung dar (Chang et al. 2009, Grimm et al. 2010, Grosse et al. 2012, Infanger et al. 2007, Ma et al. 2013, Stamenkovic et al. 2010, Ulbrich et al. 2010).

#### **4.4 Ausblick**

Eine weitere Verwendung des auf der RPM gebildeten Knorpelgewebes ist in der plastischen und regenerativen Medizin von großem Interesse. Dazu sollten zuerst Studien am Tiermodell durchgeführt werden, die ethisch zugelassen werden müssen. Zuvor sind allerdings weitere Tests mit größeren Zellmengen unterschiedlicher Spender notwendig. Da bei den gekauften Chondrozyten Alter, Geschlecht und Krankengeschichte des Zellspenders anonymisiert wurden und daher unbekannt sind, wäre es von Vorteil mit einer Klinik zusammenzuarbeiten, die patienteneigene Chondrozyten zur Verfügung stellen kann.

Außerdem ist die Messung der mechanischen Eigenschaften (Stabilität, Kompression, Druck) des neu gebildeten Knorpels notwendig. Diese Analysen werden uns die Informationen liefern, ob die produzierten Gewebestückchen ausreichend stabil sind, um Knorpel zu ersetzen oder ob sie nur an die Defektstelle angebracht werden können.

Weiterhin soll eine Optimierung des Kultivierungsprozesses erfolgen. Dies kann z.B. durch einen automatischen Mediumwechsel mit einer bestimmten veränderbaren Mediummenge erreicht werden. Solche Systeme sind bereits als Bioreaktoren vorhanden.

Um den Prozess der 3D-Kultivierung besser zu verstehen und den Trigger der Sphäroidbildung zu finden, müssen auch die Zytokine im Kultivierungsmedium identifiziert werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Mikrogravitation beeinflusst die Physiologie und den Metabolismus menschlicher Zellen und induziert unter anderem deren dreidimensionales Wachstum. Die Versuche unter realen Mikrogravitationsbedingungen sind durch lange Vorbereitungszeiten und das Warten auf die Weltraummissionen sehr teuer und zeitaufwendig. Auf der Erde kann das Erforschen der Zellen unter verändertem Schwerkrafteinfluss im optimalen Fall unter simulierten Mikrogravitationsbedingungen erfolgen, wobei die Ergebnisse in realer Mikrogravitation validiert werden müssen.

In dieser Arbeit wurde nun der Einfluss der Mikrogravitation simuliert. Es kamen etablierte Bodenanlagen wie Random Positioning Machine (RPM) und der 2D schnelldrehender Klinostat (FRC) sowie die Rotating Wall Vessel (RWV) zum Einsatz. Es wurden das Zytoskelett und die extrazelluläre Matrix der Chondrozyten von sechs verschiedenen Spendern untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen auch unter realen Mikrogravitationsbedingungen im Rahmen eines Parabelfluges erforscht.

Es wurden vergleichbare Zytoskelett-Veränderungen (Löcher und perinukleäre Akkumulation von Vimentin, kortikale Lokalisation und Stressfaserbildung von F-Aktin) auf der RPM und dem FRC sowie während eines Parabelfluges beobachtet.

Außerdem wurde die Knorpelbildung unter Mikrogravitationsbedingungen erforscht. In allen drei Bodenanlagen wurde nach drei (RWV) oder fünf bis sieben Kultivierungstagen (RPM, FRC) eine Sphäroidbildung beobachtet. Die über 28 Tage produzierten Sphäroide verfügten über Eigenschaften des realen menschlichen Knorpels, was mit molekularbiologischen, histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen bestätigt wurde. Die RPM erwies sich dabei durch die unkomplizierte Handhabung, größere Probemengen und fehlende Apoptose in den produzierten Sphäroiden als die beste Bodenanlage für das 3D Tissue Engineering. Die Bildung von Sphäroiden auf der RPM konnte durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren zum Kultivierungsmedium bis zu dreifach beschleunigt werden. Das nach 28 Tagen im Chondrozyten-Wachstumsmedium produzierte Gewebe wies außerdem die knorpelspezifische Zoneneinteilung auf.

Das Tissue Engineering des Knorpels in der simulierten Mikrogravitation bzw. auf der RPM ohne Verwendung von Trägermaterialien ist ein neuartiges und vielversprechendes Knorpelregenerationsverfahren mit einem exzellenten Potenzial für die Zukunft.

## Summary

Microgravity has an influence on the physiology, metabolism and growth of human cells and induces three-dimensional growth. However, the experiments under real microgravity conditions are expensive and time consuming due to long preparation times and waiting periods for the space missions. The impact of gravity and changes due to microgravity exposure can be studied on Earth using microgravity simulations that must be validated in the real microgravity.

In this PhD thesis the influence of gravity has been studied using established ground-based facilities such as the Random Positioning Machine (RPM), the 2D Fast-Rotating Clinostat (FRC) and the Rotating Wall Vessel (RWV). The cytoskeleton and extracellular matrix of chondrocytes from six different donors have been examined. Additionally, cells have been studied under real microgravity conditions achieved during a parabolic flight. Comparable cytoskeletal changes such as meshes and perinuclear accumulation of vimentin, cortical localisation and stress fibre formation of F-actin have been detected on the RPM and FRC as well as under real microgravity conditions.

Moreover, the cartilage tissue formation under simulated microgravity conditions has been investigated. The spheroid formation has been detected in all three ground-based facilities after 3 days (RWV) or 5-7 days (RPM, FRC) of sustained cultivation. The produced 3D aggregates had the qualities of the real human hyaline cartilage, as verified by molecular biological, histological and immunohistochemical analyses. The RPM proved to be the best ground-based facility for cartilage production due to its uncomplicated handling, larger sample sizes and the absence of apoptotic cells in the produced tissue. By the addition of growth factors to the cultivation medium the spheroid production could be accelerated up to 3 times. Moreover, in the tissue produced after 28 days in Chondrocytes Growth Medium the cartilage-specific zone division has been observed.

These findings demonstrate the tissue engineering of cartilage without any scaffolds on the RPM. This method represents a unique and promising cartilage regeneration procedure with excellent future prospects.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abdollahi T, Robertson NM, Abdollahi A, Litwack G: Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by IL-8 is mediated by the p38-MAPK pathway in OVCAR3 cells. *Apoptosis* 10. 1383-1393 (2005)
2. Akmal M, Anand A, Anand B, Wiseman M, Goodship AE, Bentley G: The culture of articular chondrocytes in hydrogel constructs within a bioreactor enhances cell proliferation and matrix synthesis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 88. 544-553 (2006)
3. Albrecht-Buehler G: The simulation of microgravity conditions on the ground. *ASGSB. Bull.* 5. 3-10 (1992)
4. **Aleshcheva G**, Sahana J, Ma X, Hauslage J, Hemmersbach R, Egli M, Infanger M, Bauer J, Grimm D: Changes in morphology, gene expression and protein content in chondrocytes cultured on a Random Positioning Machine. *PLoS One.* 8 (2013)
5. **Aleshcheva G**, Sahana J, Ma X, Hauslage J, Hemmersbach R, Egli M, Infanger M, Bauer J, Grimm D: Moderate alterations of the cytoskeleton in human chondrocytes after short-term microgravity produced by parabolic flight manoeuvres could be prevented by upregulation of BMP-2 and SOX-9. *FASEB J.* [Epub ahead of print] (2015)
6. Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE: Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res.* 18. 223-34 (1988)
7. Bader DL, Kempson GE: The short-term compressive properties of adult human articular cartilage. *Biomed. Mater. Eng.* 4. 245-56 (1994)
8. Bae DK, Yoon KH, Song SJ: Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. *Arthroscopy* 22. 367–374 (2006)
9. Barzegari A, Saei AA: An update to space biomedical research: tissue engineering in microgravity bioreactors. *Bioimpacts* 2. 23-32 (2012)
10. Beckmann R, Houben A, Tohidnezhad M, Kweider N, Fragoulis A, Wruck CJ, Brandenburg LO, Hermanns-Sachweh B, Goldring MB, Pufe T, Jahr H: Mechanical forces induce changes in VEGF and VEGFR-1/sFlt-1 expression in human chondrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 15. 15456-15474 (2014)
11. Benjamin M, Archer CW, Ralphs JR: Cytoskeleton of cartilage cells. *Microsc. Res. Tech.* 28. 372-377 (1994)
12. Blain EJ: Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology. *Int. J. Exp. Path.* 90. 1-15 (2009)

13. Blanchard JM: Cyclin A2 transcriptional regulation: modulation of cell cycle control at the G1/S transition by peripheral cues. *Biochem. Pharmacol.* 60. 1179-1184 (2000)
14. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Lent PL, van de Loo FA, van den Berg WB, van der Kraan PM: Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling. *Arthritis Res. Ther.* 9. 102 (2007)
15. Bobi V: Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 3. 262-264 (1996)
16. Bobic V: Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions. *Orthopäde* 28. 19-25 (1999)
17. Boonstra J: Growth factor-induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity. *FASEB J.* 13. 35-42 (1999)
18. Briegleb W: Some qualitative and quantitative aspects of the fast-rotating clinostat as a research tool. *AGSB Bull.* 5. 23-30 (1992)
19. Brighton CT, Kitajima T, Hunt RM: Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 27. 1290-1299 (1984)
20. Bruns J, Kampen J, Kahrs J, Plitz W: Autologousmeniscus replacement with rib perichondrium. Experimental results. *Orthopäde* 29. 145-150 (2000)
21. Buckwalter JA: Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: experimental studies. *J. Rheumatol. Suppl.* 43. 13-15 (1995)
22. Buravkova LB, Romanov YA: The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity. *Acta Astronaut.* 48. 647-650 (2001)
23. Carlsson SIM, Bertilaccio MTS, Ballabio E, Maier JAM: Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. *Biochim. Biophys. Acta* 1642. 173-179 (2003)
24. Carmeliet G, Bouillon R: The effect of microgravity on morphology and gene expression of osteoblasts in vitro. *FASEB J.* 13. 129-134 (1999)
25. Cerwinka WH, Sharp SM, Boyan BD, Zhau HE, Chung LW, Yates C: Differentiation of human mesenchymal stem cell spheroids under microgravity conditions. *Cell. Regen. (Lond.)* 1. 2 (2012)



26. Chang RW, Falconer J, Stulberg SD, Arnold WJ, Manheim LM, Dyer AR: A randomized controlled trial of arthroscopic surgery versus closed needle joint lavage for patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis. Rheum.* 36. 289-296 (1993)
27. Chang TT, Hughes-Fulford M: Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng. Part A* 15. 559-567 (2009)
28. Chang TT, Hughes-Fulford M: Molecular mechanisms underlying the enhanced functions of three-dimensional hepatocyte aggregates. *Biomaterials* 35. 2162-2171 (2014)
29. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162. 156-159 (1987)
30. Civinini R, Nistri L, Martini C, Redl B, Ristori G, Innocenti M: Growth factors in the treatment of early osteoarthritis. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 10. 26-29 (2013)
31. Crawford-Young SJ: Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *Int J Dev. Biol.* 50. 183-191 (2006)
32. Darling EM, Athanasiou KA: Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J. Orthop. Res.* 23. 425-432 (2005)
33. Davies DL, Bouldin DW: A Cluster Separation Measure. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 1. 224-227 (1979)
34. Duke PJ, Daane EL, Montufar-Solis D: Studies of chondrogenesis in rotating systems. *J. Cell. Biochem.* 51. 274-282 (1993)
35. Durrant LA, Archer CW, Benjamin M, Ralphs JR: Organisation of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture. *J. Anat.* 194. 343-353 (1999)
36. Eggli PS, Hunziker EB, Schenk RK: Quantitation of structural features characterizing weight- and less-weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. *Anat. Rec.* 222. 217-227 (1988)
37. Eiermann P, Kopp S, Hauslage J, Hemmersbach R, Gerzer R, Ivanova K: Adaptation of a 2D clinostat for simulated microgravity experiments with adherent cells. *Micrograv Sci Technol.* 25. 153-159 (2013)
38. Ernst H, Zanin MK, Everman D, Hoffman S: Receptor-mediated adhesive and anti-adhesive functions of chondroitin sulfate proteoglycan preparations from embryonic chicken brain. *J. Cell. Sci.* 108. 3807-3816 (1995)

39. Felson DT, Buckwalter J: Debridement and lavage for osteoarthritis of the knee. *N. Engl. J. Med.* 347. 132-133 (2002)
40. Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280. 1358-1366 (2001)
41. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9. 669-676 (2003)
42. Földes I, Kern M, Szilágyi T, Oganov VS: Histology and histochemistry of intervertebral discs of rats participated in spaceflight. *Acta Biol. Hung.* 47. 145-156 (1996)
43. Gao L, Sheu TJ, Dong Y, Hoak DM, Zuscik MJ, Schwarz EM, Hilton MJ, O'Keefe RJ, Jonason JH: TAK1 regulates SOX9 expression in chondrocytes and is essential for postnatal development of the growth plate and articular cartilages. *J. Cell. Sci.* 126. 5704-5713 (2013)
44. Gershovich P, Gershovich J, Buravkova L: Cytoskeleton structure and adhesion properties of human stromal precursors under conditions of simulated microgravity. *Cell. Tissue Biol.* 3. 423-430 (2009)
45. Glade N, Beaugnon E, Tabony J: Ground-based methods reproduce space-flight experiments and show that weak vibrations trigger microtubule selforganisation. *Biophys. Chem.* 121. 1-6 (2006)
46. Gomoll AH, Probst C, Farr J, Cole BJ, Minas T: Use of type I/III bilayer collagen membrane decreases reoperation rates for symptomatic hypertrophy after autologous chondrocyte implantation. *Am. J. Sports Med.* 37. 20-23 (2009)
47. Gooding CR, Bartlett W, Bentley G, Skinner JA, Carrington R, Flanagan A: A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *Knee* 13. 203-210 (2006)
48. Greenwald AS, Haynes DW: A pathway for nutrients from the medullary cavity to the articular cartilage of the human femoral head. *J. Bone Joint Surg. Br.* 51. 747-753 (1969)
49. Grenon SM, Jeanne M, Aguado-Zuniga J, Conte MS, Hughes-Fulford M: Effects of gravitational mechanical unloading in endothelial cells: association between caveolins, inflammation and adhesion molecules. *Sci. Rep.* 3. 1494 (2013)
50. Grimm D, Bauer J, Kossmehl P, Shakibaei M, Schönberger J, Pickenhahn H, Schulze-Tanzil G, Vetter R, Eilles C, Paul M, Cogoli A: Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. *FASEB J.* 16. 604-606 (2002a)

51. Grimm D, Kossmehl P, Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Pickenhahn H, Bauer J, Paul M, Cogoli A: Effects of simulated microgravity on thyroid carcinoma cells. *J. Gravit. Physiol.* 9. 253-256 (2002b)
52. Grimm D, Bauer J, Infanger M, Cogoli A: The use of the random positioning machine for the study of gravitational effects on signal transduction in mammalian cells. *Signal Transduction* 6. 388-396 (2006)
53. Grimm D, Bauer J, Ulbrich C, Westphal K, Wehland M, Infanger M, **Aleshcheva G**, Pietsch J, Ghardi M, Beck M, El-Saghire H, de Saint-Georges L, Baatout S: Different responsiveness of endothelial cells to vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor added to culture media under gravity and simulated microgravity. *Tissue Eng. Part A* 16. 1559-1573 (2010)
54. Grimm D, Wise P, Lebert M, Richter P, Baatout S: How and why does the proteome respond to microgravity? *Expert Rev. Proteomics* 8. 13-27 (2011)
55. Grimm D, Wehland M, Pietsch J, **Aleshcheva G**, Wise P, van Loon J, Ulbrich C, Magnusson NE, Infanger M, Bauer J: Growing Tissues in Real and Simulated Microgravity: New Methods for Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* [Epub ahead of print] (2014)
56. Grosse J, Wehland M, Pietsch J, Schulz H, Saar K, Hübner N, Eilles C, Bauer J, Abou-El-Ardat K, Baatout S, Ma X, Infanger M, Hemmersbach R, Grimm D: Gravity-sensitive signaling drives 3-dimensional formation of multicellular thyroid cancer spheroids. *FASEB J.* 26. 5124-5140 (2012)
57. Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M: Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum.* 38. 960-968 (1995)
58. Guilak F, Mow V: C:Determination of the mechanical response of the chondrocyte in situ using confocal microscopy and finite element analysis. *Advances in Bioengineering, ASME* 22. 21-23 (1992)
59. Hammond TG, Benes E, O'Reilly KC, Wolf DA, Linnehan RM, Taher A, Kaysen JH, Allen PL, Goodwin TJ: Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiol. Genomics* 3. 163-173 (2000)
60. Hensler D: Effekt von Bone Morphogenetic Protein 2 auf die Knorpel-/Knochenregeneration am Kaninchenmodell - Histologische und Immunhistologische Ergebnisse. Dissertation, Deutsche Nationalbibliothek (2009)
61. Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M, Buchen B: Evaluation of the threedimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta.* 203. 187-197 (1997)

62. Hosseini-Farahabadi S, Geetha-Loganathan P, Fu K, Nimmagadda S, Yang HJ, Richman JM: Dual functions for WNT5A during cartilage development and in disease. *Matrix Biol.* 32. 252-264 (2013)
63. Huang Y, Dai ZQ, Ling SK, Zhang HY, Wan YM, Li YH: Gravity, a regulation factor in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 16. 87 (2009)
64. Hughes-Fulford M, Gilbertson V: Osteoblast fibronectin mRNA, protein synthesis, and matrix are unchanged after exposure to microgravity. *FASEB J.* 13. 121-127 (1999)
65. Hunziker EB, Quinn TM, Häuselmann HJ: Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 10. 564-572 (2002)
66. Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Cogoli A, Faramarzi S, Bauer J, Curcio F, Paul M, Grimm D: Longterm conditions of mimicked weightlessness influences the cytoskeleton in thyroid cells. *J. Gravit. Physiol.* 11. 169-172 (2004)
67. Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Bauer J, Kossmehl-Zorn S, Cogoli A, Curcio F, Oksche A, Wehland M, Kreutz R, Paul M, Grimm D: Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell. Tissue Res.* 324. 267-277 (2006)
68. Infanger M, Ulbrich C, Baatout S, Wehland M, Kreutz R, Bauer J, Grosse J, Vadrucchi S, Cogoli A, Derradji H, Neefs M, Küsters S, Spain M, Paul M, Grimm D: Modeled gravitational unloading induced downregulation of endothelin-1 in human endothelial cells. *Cell. Biochem.* 101. 1439-1455 (2007)
69. Ingber DE: Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J. Cell. Sci.* 116. 1157-1173 (2003(a))
70. Ingber DE: Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J. Cell. Sci.* 116. 1397-1408 (2003(b))
71. Ingber D: How cells (might) sense microgravity. *FASEB J.* 13. 3-15 (1999)
72. Ishikawa M, Sekine K, Okamura A, Zheng YW, Ueno Y, Koike N, Tanaka J, Taniguchi H: Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 111. 711-718 (2011)
73. Jakob M, Démariseau O, Schäfer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I: Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J. Cell. Biochem.* 81. 368-377 (2001)

74. Jurvelin JS, Arokoski JP, Hunziker EB, Helminen HJ: Topographical variation of the elastic properties of articular cartilage in the canine knee. *J. Biomech.* 33. 669-675 (2000)
75. Kawata M, Sekiya S, Kera K, Kimura H, Takamizawa H: Neural rosette formation within in vitro spheroids of a clonal human teratocarcinoma cell line, PA-1/NR: role of extracellular matrix components in the morphogenesis. *Cancer Res.* 51. 2655-2669 (1991)
76. Kempson GE, Muir H, Swanson SA, Freeman MA: Correlations between stiffness and the chemical constituents of cartilage on the human femoral head. *Biochim. Biophys. Acta.* 215. 70-77 (1970)
77. Klaus DM: Clinostats and bioreactors. *Gravit. Space Biol. Bull.* 14. 55-64 (2001)
78. Kossmehl P, Shakibaei M, Cogoli A, Pickenhahn H, Paul M, Grimm D: Simulated microgravity induces programmed cell death in human thyroid carcinoma cells. *J. Gravit. Physiol.* 9. 285-296 (2002)
79. Krejci P, Krakow D, Mekikian PB, Wilcox WR: Fibroblast growth factors 1, 2, 17, and 19 are the predominant FGF ligands expressed in human fetal growth plate cartilage. *Pediatr. Res.* 61. 267-272 (2007)
80. Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, Krause SJ, Konrad G, Uhl M, Südkamp N: Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 14. 1119–1125 (2006)
81. Langelier E, Suetterlin R, Aebi U, Buschmann MD: Zonal dependence of the chondrocyte cytoskeleton and in vitro response to load. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 24. 631 (1999)
82. Legate KR, Wickstrom SA, Fassler R: Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23. 397–418 (2009)
83. Lewis ML, Rexnolds JL, Cubano LA, Hatton JP, Lawless BD, Piepmeier EH: Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J.* 12. 1007-1018 (1998)
84. Lewis ML: The cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity. *Adv. Space Biol. Med.* 8. 77–128 (2002)
85. Li J, Zhang S, Chen J, Du T, Wang Y, Wang Z: Modeled microgravity causes changes in the cytoskeleton and focal adhesions, and decreases in migration in malignant human MCF-7 cells. *Protoplasma* 238. 23–33 (2009)
86. Ma X, Wehland M, Schulz H, Saar K, Hübner N, Infanger M, Bauer J, Grimm D: Genomic

- approach to identify factors that drive the formation of three-dimensional structures by EA.hy926 endothelial cells. PLoS One 8: e64402 (2013)
87. Ma X, Pietsch J, Wehland M, Schulz H, Saar K, Hübner N, Bauer J, Braun M, Schwarzwälder A, Segerer J, Birlem M, Horn A, Hemmersbach R, Waßer K, Grosse J, Infanger M, Grimm D: Differential gene expression profile and altered cytokine secretion of thyroid cancer cells in space. FASEB J. 28. 813-835 (2014)
  88. Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, Kon E, Pederzini L, Rosa D, Sacchetti GL, Stefani G, Zanasi S: Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. Clin. Orthop. Relat. Res. 435. 96–105 (2005)
  89. Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Schlegel W: Collagen expression in tissue engineered cartilage of aged human articular chondrocytes in a rotating bioreactor. Int. J. Artif. Organs 26. 319-330 (2003(a))
  90. Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Vécsei V: Chondrogenesis of aged human articular cartilage in a scaffold-free bioreactor. Tissue Eng. 9. 1215-1226 (2003(b))
  91. Martinez I, Elvenes J, Olsen R, Bertheussen K, Johansen O: Redifferentiation of *in vitro* expanded adult articular chondrocytes by combining the hanging-drop cultivation method with hypoxic environment. Cell. Transplant. 17. 987–996 (2008)
  92. Matsuoka S, Asano Y, Sano K, Kishimoto H, Yamashita I, Yorifuji H, Utsuyama M, Hirokawa K, Tada T: A novel type of cell death of lymphocytes induced by a monoclonal antibody without participation of complement. J. Exp. Med. 181. 2007-2015 (1995)
  93. Meloni MA, Galleri G, Pippia P, Cogoli-Greuter M: Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modelled low gravity. Protoplasma 229. 243–249 (2006)
  94. Meyers VE, Zayzafoon M, Douglas JT, McDonald JM: RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. J. Bone Mineral. Res. 20. 1858–1866 (2005)
  95. Michigami T: Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. Cell. Mol. Life Sci. 70. 4213-4221 (2013)
  96. Moes MJA, Gielen JC, Bleichrodt R-J, van Loon JJWA, Christianen PCM, Boonstra J: Simulation of microgravity by magnetic levitation and random positioning: effect on human A431 cell morphology. Micrograv. Sci. Tech. 23. 249–261 (2011)
  97. Nishi M, Matsumoto R, Dong J, Uemura T: Engineered bone tissue associated with vascularization utilizing a rotating wall vessel bioreactor. J. Biomed. Mater. Res. A 101. 421-427 (2013)

98. Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G, Freed LE: Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol. Bioeng.* 63. 197-205 (1999)
99. Ogilvie-Harris DJ, Fitsialos DP: Arthroscopic management of the degenerative knee. *Arthroscopy* 7. 151-157 (1991)
100. Pache C, Kühn J, Westphal K, Toy MF, Parent JM, Büchi O, Franco-Obregón A, Depeursinge C, Egli M: Digital holographic microscopy real-time monitoring of cytoarchitectural alterations during simulated microgravity. *J. Biomed. Optics* 15. (2010)
101. Papaseit C, Pochon N, Tabony J: Microtubule self-organization is gravity-dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97. 8365-8368 (2000)
102. Pässler HH: Microfracture for treatment of cartilage defects. *Zentralbl. Chir.* 125. 500-504 (2000)
103. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A: Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 374. 212-234 (2000)
104. Pickenhahn HJ: Untersuchung der Auswirkungen simulierter Schwerelosigkeit auf Schilddrüsenzellen. Dissertation, Journal-Nr. 2983, Mensch Buch Verlag (2005)
105. Pietsch J, Bauer J, Egli M, Infanger M, Wise P, Ulbrich C, Grimm D: The effects of weightlessness on the human organism and mammalian cells. *Curr. Mol. Med.* 11. 350-364 (2011)
106. Pietsch J, Ma X, Wehland M, Aleshcheva G, Schwarzwälder A, Segerer J, Birlem M, Horn A, Bauer J, Infanger M, Grimm D: Spheroid formation of human thyroid cancer cells in an automated culturing system during the Shenzhou-8 Space mission. *Biomaterials* 34. 7694-7705 (2013)
107. Pitzke P, Bujia J, Wilmes E, Hammer C: Expression of ICAM1 on isolated human nasal, auricular and costal chondrocytes. *Acta Otolaryngol.* 114. 81-86 (1994)
108. Pogue R, Lyons K: BMP signaling in the cartilage growth plate. *Curr. Top. Dev. Biol.* 76. 1-48 (2006)
109. Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, Mentlein R: Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *Am. J. Pathol.* 164.185-192 (2004)
110. Pufe T, Kurz B, Petersen W, Varoga D, Mentlein R, Kulow S, Lemke A, Tillmann B: The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the

- bone and joint system. *Ann. Anat.* 187. 461-472 (2005)
111. Radtke AL, Herbst-Kralovetz MM: Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models. *J. Vis. Exp.* 62 (2012)
  112. Reddi AH: Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83A. 1-6 (2001)
  113. Rijken PJ, de Groot RP, Kruijer W, de Laat SW, Verkleij AJ, Boonstra J: Identification of specific gravity sensitive signal transduction pathways in human A431 carcinoma cells. *Adv. Space Res.* 12. 145–152 (1991)
  114. Rösner H, Wassermann T, Möller W, Hanke W: Effects of altered gravity on the actin and microtubule cytoskeleton of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Protoplasma* 229. 225–234 (2006)
  115. Rudert M, Wirth CJ, Schulze M, Reiss G: Synthesis of articular cartilage-like tissue in vitro. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 117. 141-146 (1998)
  116. Ryu JH, Yang S, Shin Y, Rhee J, Chun CH, Chun JS: Interleukin-6 plays an essential role in hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ -induced experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis Rheum.* 63. 2732-2743 (2011)
  117. Sakai S, Mishima H, Ishii T, Akaogi H, Yoshioka T, Ohyabu Y, Chang F, Ochiai N, Uemura T: Rotating three-dimensional dynamic culture of adult human bone marrow-derived cells for tissue engineering of hyaline cartilage. *J. Orthop. Res.* 27. 517-521 (2009)
  118. Saleem M, Qadir MI, Perveen N, Ahmad B, Saleem U, Irshad T, Ahmad B: Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. *Chem. Biol. Drug Des.* 82. 243-251 (2013)
  119. Salomon F-V, Geyer H, Gille U: *Anatomie für die Tiermedizin.* pp. 40-42. Enke. Stuttgart 2008
  120. Salter DM, Hughes DE, Simpson R, Gardner DL: Integrin expression by human articular chondrocytes. *British. J. Rheumatol.* 31. 231-234 (1992)
  121. Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Haspl M, Bohnsack M, Fortems Y, Vandekerckhove B, Almqvist KF, Claes T, Handelberg F, Lagae K, van der Bauwhede J, Vandenuecker H, Yang KG, Jelic M, Verdonk R, Veulemans N, Bellemans J, Luyten FP: Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am. J. Sports Med.* 36. 235–246 (2008)



122. Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Almqvist KF, Verdonk R, Bellemans J, Luyten FP; TIG/ACT/01/2000&EXT Study Group: Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture. *Am. J. Sports Med.* 37. 10-19 (2009)
123. Schmidt W: Quickly changing accelerations forces (QCAFs) vibration analysis on the A300 ZERO-G. *Microgravity Sci. Technol.* 15. 42-48 (2004)
124. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, Schlegel J: Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 10. 62-70 (2002)
125. Schwarzenberg M, Pippia P, Meloni MA, Cossu G, Cogoli-Greuter M, Cogoli A: Signal transduction in T lymphocytes - a comparison of the data from space, the free fall machine and the random positioning machine. *Adv. Space Res.* 24. 793-800 (1999)
126. Sciola L, Cogoli-Greuter M, Cogoli A, Spano A, Pippia P: Influence of microgravity on mitogen binding and cytoskeleton in Jurkat cells. *Adv. Space Res.* 24. 801-805 (1999)
127. Shu B, Zhang M, Xie R, Wang M, Jin H, Hou W, Tang D, Harris SE, Mishina Y, O'Keefe RJ, Hilton MJ, Wang Y, Chen D: BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *J. Cell. Sci.* 124. 3428-3440 (2011)
128. Siebold R, Pässler H: Operative Maßnahmen zur Versorgung von Knorpelschäden am Kniegelenk. *ATOSnews* 13. 22-27 (2009)
129. Smith RL, Trindade MC, Ikenoue T, Mohtai M, Das P, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ: Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology* 37. 95-107 (2000)
130. Smith RL, Carter DR, Schurman DJ: Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 427. 89-95 (2004)
131. Song K, Wang H, Zhang B, Lim M, Liu Y, Liu T: Numerical simulation of fluid field and in vitro three-dimensional fabrication of tissue-engineered bones in a rotating bioreactor and in vivo implantation for repairing segmental bone defects. *Cell Stress Chaperones* 18. 193-201 (2013)
132. Stamenkovic V, Keller G, Nesic D, Cogoli A, Grogan SP: Neocartilage formation in 1g, simulated, and microgravity environments: implications for tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* 16. 1729-1736 (2010)
133. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ: The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade.* 28. 26-32 (1999)

134. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ: Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. Clin Orthop Relat Res. 391. 362-369 (2001)
135. Steinert A, Weber M, Dimmler A, Julius C, Schütze N, Nöth U, Cramer H, Eulert J, Zimmermann U, Hendrich C: Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. J. Orthop. Res. 21. 1090-1097 (2003)
136. Tabony J, Rigotti N, Glade N, Cortès S: Effect of weightlessness on colloidal particle transport and segregation in self-organising microtubule preparations. Biophys. Chem. 127. 172-180 (2007)
137. Takebe T, Kobayashi S, Kann H, Suzuki H, Yabuki Y, Mizuno M, Adegawa T, Yoshioka T, Tanaka J, Maegawa J, Taniguchi H: Human elastic cartilage engineering from cartilage progenitor cells using rotating wall vessel bioreactor. Transplant. Proc. 44. 1158-1161 (2012)
138. ten Dijke P, Hill CS: New insights into TGF-beta-Smad signaling. Trends Biochem. Sci. 29. 265-273 (2004)
139. Thermann H, Paessler H, Rössing S: Neue Technik zur arthroskopischen, autologen Chondrozytentransplantation mittels Chondrosphären. Z. Orthop. Unfallchir. 145. 276-277 (2007)
140. Trickey WR, Vail TP, Guilak F: The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes. J. Orthop. Res. 22. 131-139 (2004)
141. Ulbrich C, Westphal K, Baatout S, Wehland M, Bauer J, Flick B, Infanger M, Kreutz R, Vadrucci S, Egli M, Cogoli A, Derradji H, Pietsch J, Paul M, Grimm D: Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity. J. Cell. Biochem. 104. 1324-1341 (2008)
142. Ulbrich C, Westphal K, Pietsch J, Winkler HDF, Leder A, Bauer J, Kossmehl P, Grosse J, Schoenberger J, Infanger M, Egli M, Grimm D: Characterization of human chondrocytes exposed to simulated microgravity. Cell. Physiol. Biochem 25. 551-560 (2010)
143. Ulbrich C, Pietsch J, Grosse J, Wehland M, Schulz H, Saar K, Hübner N, Hauslage J, Hemmersbach R, Braun M, van Loon J, Vagt N, Egli M, Richter P, Einspanier R, Sharbati S, Baltz T, Infanger M, Ma X, Grimm D: Differential gene regulation under altered gravity conditions in follicular thyroid cancer cells: relationship between the extracellular matrix and the cytoskeleton. Cell. Physiol. Biochem. 28. 185-198 (2011)
144. Ulbrich C, Wehland M, Pietsch J, **Aleshcheva G**, Wise P, van Loon J, Magnusson N, Infanger M, Grosse J, Eilles C, Sundaresan A, Grimm D: The Impact of Simulated and Real Microgravity on Bone Cells and Mesenchymal Stem Cells. Biomed Res Int. 928507 (2014)
145. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. Articular cartilage

- biology. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 11. 421-430 (2003)
146. Uva BM, Masini MA, Sturla M, Prato P, Passalacqua M, Giuliani M, Tagliafierro G, Strollo F: Clinorotation- induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain Res.* 934. 132–139 (2002)
  147. Valmikinathan CM, Hoffman J, Yu X: Impact of scaffold micro and macro architecture on Schwann cell proliferation under dynamic conditions in a Rotating Wall Vessel bioreactor. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 31. 22-29 (2011)
  148. Vorselen D, Roos WH, MacKintosh FC, Wuite GJ, van Loon JJ: The role of the cytoskeleton in sensing changes in gravity by nonspecialized cells. *FASEB J.* 28. 536-547 (2014)
  149. Wakabayashi T, Matsumine A, Nakazora S, Hasegawa M, Iino T, Ota H, Sonoda H, Sudo A, Uchida A: Fibulin-3 negatively regulates chondrocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391. 1116-1121 (2010)
  150. Wang P, Zhu F, Tong Z, Konstantopoulos K: Response of chondrocytes to shear stress: Antagonistic effects of the binding partners Toll-like receptor 4 and caveolin-1. *FASEB J.* 25. 3401-3415 (2011)
  151. Weber M, Sotoca AM, Kupfer P, Guthke R, van Zoelen EJ: Dynamic modelling of microRNA regulation during mesenchymal stem cell differentiation. *BMC Syst. Biol.* 7. 124 (2013)
  152. Wehland M, Ma X, Braun M, Hauslage J, Hemmersbach R, Bauer J, Grosse J, Infanger M, Grimm D: The impact of altered gravity and vibration on endothelial cells during a parabolic flight. *Cell. Physiol. Biochem.* 31. 432-451 (2013)
  153. **Wehland M, Aleshcheva G**, Schulz H, Saar K, Hübner N, Hemmersbach R, Braun M, Ma X, Frett T, Warnke E, Riwaldt R, Pietsch P, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D: Differential gene expression of human chondrocytes cultured under short-term altered gravity conditions during parabolic flight maneuvers. *Cell Commun. Signal* 13. 18 (2015)
  154. Wu L, Gonzalez S, Shah S, Kyupelyan L, Petrigliano FA, McAllister DR, Adams JS, Karperien M, Tuan TL, Benya PD, Evseenko D: Extracellular matrix domain formation as an indicator of chondrocyte dedifferentiation and hypertrophy. *Tissue Eng. Part C* 13. [Epub ahead of print] (2013)
  155. Yang F, Dai Z, Tan Y, Li Y: Effects of altered gravity on the cytoskeleton of neonatal rat cardiocytes. *Micrograv. Sci. Tech.* 22. 45–52 (2010)
  156. Yang X, Wang D, Hao J, Gong M, Arlet V, Balian G, Shen FH, Li XJ: Enhancement of matrix production and cell proliferation in human annulus cells under bioreactor culture. *Tissue Eng. Part A* 17. 1595-1603 (2011)

157. Yuan W, Zhao MD, Yuan FL, Che W, Duan PG, Liu Y, Dong J: Association of endothelin-1 expression and cartilaginous endplate degeneration in humans. PLoS One 8:e60062 (2013)
  
158. Zhang Y, Chee A, Shi P, Wang R, Moss I, Chen EY, He TC, An HS: Allogeneic articular chondrocyte transplantation downregulates interleukin 8 gene expression in the degenerating rabbit intervertebral disk in vivo. Am. J. Phys. Med. Rehabil. [Epub ahead of print] (2013)
  
159. Zuzarte-Luis V, Hurle JM: Programmed cell death in the developing limb. Int. J. Dev. Biol. 46. 871-876 (2002)
  
160. Zvezdaryk KJ, Warner JA, Machado HL, Morris CA, Honer zu Bentrup K: Rotating cell culture systems for human cell culture: human trophoblast cells as a model. J. Vis. Exp. 59 (2012)

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Knorpelarten .....	10
Abbildung 2:	Zonen des hyalinen Knorpels .....	11
Abbildung 3:	Bodenanlagen zur Simulation der Mikrogravitation .....	17
Abbildung 4:	Rotating Wall Vessel mit Zubehör .....	20
Abbildung 5:	Parabelflug-Experiment .....	30
Abbildung 6:	Hypergravitationsexperimente auf der SAHC .....	31
Abbildung 7:	Vibrationsexperimente auf der Vibraplex (DLR, Köln) .....	32
Abbildung 8:	Die während der Doktorarbeit durchgeführten Versuche .....	40
Abbildung 9:	Immunofluoreszenz-Färbung von $\beta$ -Tubulin und Vimentin in Chondrozyten nach der Kurzzeit-Exposition auf der RPM .....	41
Abbildung 10:	Verteilung des F-Aktins in Chondrozyten nach der Kurzzeit-Exposition auf der RPM .....	42
Abbildung 11:	Histologische Untersuchung der Chondrozyten nach der Kurzzeit-Exposition auf der RPM .....	43
Abbildung 12:	Western Blot Analyse von Kollagen II nach Kurzzeit-Exposition auf der RPM .....	44
Abbildung 13:	Genexpression und Proteingehalt der Chondrozyten nach der Kurzzeit-Exposition auf der RPM .....	46
Abbildung 14:	Immunfluoreszenz-Färbungen von Chondrozyten nach FRC-Exposition .....	47
Abbildung 15:	F-Aktin-Färbungen von auf dem FRC kultivierten humanen Chondrozyten .....	49
Abbildung 16:	Immunfluoreszenz-Färbungen der zytoskelettalen Komponenten nach Parabelflug-Exposition .....	50
Abbildung 17:	Verteilung des F-Aktins in den Chondrozyten beim Parabelflug .....	51
Abbildung 18:	Genexpression und Proteingehalt der Chondrozyten beim Parabelflug .....	52
Abbildung 19:	Veränderung von $\beta_1$ -Integrin in Chondrozyten beim Parabelflug .....	53
Abbildung 20:	Änderungen in der Genexpression und Proteingehalt durch den Parabelflug .....	55
Abbildung 21:	Heatmap der Clusterbildung von unterschiedlich exprimierten Transkripten der Microarray-Experimente nach dem Parabelflug .....	55
Abbildung 22:	qPCR Analyse von Chondrozyten nach dem Parabelflug .....	56
Abbildung 23:	ELISA von IL-6 in dem Zellkulturüberstand .....	57
Abbildung 24:	qPCR Analyse von Chondrozyten nach der Vibraplex-Exposition .....	58
Abbildung 25:	Sphäroidbildung in den Bodenanlagen zur Mikrogravitationssimulation .....	59
Abbildung 26:	Sphäroidbildung in der RWV .....	61
Abbildung 27:	Histologische Analyse des knorpelähnlichen Gewebes nach Bildung in der RWV ..	61
Abbildung 28:	Nachweis von knorpelspezifischen Bestandteilen in RWV-Sphäroiden .....	62
Abbildung 29:	Nachweis von Apoptose in den in der RWV produzierten Sphäroiden .....	63

Abbildung 30: Detektion der Apoptose in den in der RWV gebildeten Sphäroiden.....	63
Abbildung 31: Verwandlung der 3 Tage alten Sphäroide zu einer Monolayer-Kultur.....	64
Abbildung 32: Morphologische Unterschiede der Chondrozyten .....	65
Abbildung 33: Mikroskopische Analyse der auf der RPM produzierten Sphäroide .....	66
Abbildung 34: Nachweis der knorpelspezifischen EZM Komponenten in den in der RWV produzierten Sphäroiden.....	67
Abbildung 35: Zoneneinteilung im auf der RPM produzierten Knorpel .....	68

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Veränderungen von Chondrozyten nach RPM-, FRC- und RWV-Exposition.....	48
Tabelle 2: Unterschiede in der Chondrozyten-Handhabung in den Bodenanlagen.....	60

## Acknowledgement

My biggest thank and appreciation goes to Professor Daniela Grimm, an expert in the field of space biology, thyroid cancer cell research and tissue engineering. Only under her excellent supervision, her care and support, it was possible for me to do this work. During the PhD time we developed special, nearly familiar relationship and I appreciate it very much.

I want to thank PD Dr. Ruth Hemmersbach for her advices and numerous corrections of my manuscripts. Her concise type, clarity and professionalism always motivated me.

I thank Professor Manfred Infanger for his support during the thesis preparation.

My dear colleagues in Germany – Dr. Markus Wehland, Dr. Jessica Pietsch, Dr. Johann Bauer, Elisabeth Warnke, Stefan Riwaldt and Sascha Kopp - always supported me. All the work I've done was possible only through teamwork with them.

I also would like to thank Dr. Xiao Ma and Jayashree Sahana from Aarhus University (Denmark). I am very thankful for their help with experiments in Denmark. Xiao and Jay will always stay on my mind and are always welcome to visit me.

I thank SpaceLife for scholarship and such a wonderful time. I enjoyed every workshop, every single course and time spent together with other doctoral candidates. I hope very much to see them in my future career and collaborate with them.

I also thank German Space Agency (DLR) and the European Space Agency (ESA) for financial support of my PhD.

In the end, I thank my boyfriend Paul. After more then 9 years together, he knows all my highs and lows, all my advantages and disadvantages... He really knows, how much work it was and what does it mean for me. I appreciate it very much.

## Vorträge und Publikationen

### Vorträge

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit wurden bei folgenden Kongressen und Konferenzen vorgetragen:

12.06.13	Symposium, Aarhus Universität (Dänemark); Vorstellung der ersten Dissertationsergebnisse
7 – 12.07.13	IAA 19 „Humans in Space“ Symposium (Köln, Deutschland), Vortrag in der „Student Session“ zum Thema „Changes of morphology and gene expression of chondrocytes cultured on a Random Positioning Machine“
8.12.13	Gravimeeting 2013 (Erlangen, Deutschland); Vortrag zum Thema: „Short-term effects of simulated microgravity on gene expression and protein content of chondrocytes“
02.08.14 – 10.08.14	„COSPAR 2014“ (Moskau, Russland); Vortrag zum Thema: „Changes of morphology, gene expression and protein content of chondrocytes cultured on a 3D Random Positioning Machine and on a 2D rotating clinostat“
23.09.14 – 26.09.14	„Tissue Engineering and Regenerative Medicine“ (Valencia, Spanien); Vortrag zum Thema: „Tissue Engineering of cartilage: Changes of morphology, gene expression and protein content of chondrocytes cultured on a 3D Random Positioning Machine and on a 2D rotating clinostat“
4.11.14	Symposium, Aarhus Universität (Dänemark); Vortrag zum Thema: „Tissue Engineering of cartilage“
11.12.14	Gravimeeting 2014 (Erlangen, Deutschland); Thema: „Tissue Engineering of cartilage on a 3D Random Positioning Machine“
7-12.06.15	36th Annual International Gravitational Physiology Meeting; Vortrag zum Thema: „Tissue Engineering of cartilage on a 3D Random Positioning Machine“



## Publikationen

Grimm D, Bauer J, Ulbrich C, Westphal K, Wehland M, Infanger M, **Aleshcheva G**, Pietsch J, Ghardi M, Beck M, el-Saghire H, de Saint-Georges L, and Baatout S. Different responsiveness of endothelial cells to VEGF and bFGF added to culture media under gravity and simulated microgravity. *Tissue Eng. Part A*. 16. 1559-1573 (2010)

Ma X, Wehland M, **Aleshcheva G**, Hauslage J, Waßer K, Hemmersbach R, Infanger M, Bauer J, Grimm D. Interleukin-6 Expression under Gravitational Stress Due to Vibration and Hypergravity in Follicular Thyroid Cancer Cells. *PLoS One*. 8. e68140 (2013)

Pietsch J, Ma X, Wehland M, **Aleshcheva G**, Schwarzwälder A, Segerer J, Birlem M, Horn A, Bauer J, Infanger M, Grimm D. Spheroid formation of human thyroid cancer cells in an automated culturing system during the Shenzhou-8 Space mission. *Biomaterials* 34. 7694-7705 (2013)

**Aleshcheva G**, Sahana J, Ma X, Hauslage J, Hemmersbach R, Egli M, Infanger M, Bauer J, Grimm D. Changes in morphology, gene expression and protein content in chondrocytes cultured on a Random Positioning Machine. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0079057 (2013)

Grimm D, Wehland M, Pietsch J, **Aleshcheva G**, Wise P, van Loon J, Ulbrich C, Magnusson NE, Infanger M, Bauer J. Growing Tissues in Real and Simulated Microgravity: New Methods for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. [Epub ahead of print] (2014)

Ulbrich C, Wehland M, Pietsch J, **Aleshcheva G**, Wise P, van Loon J, Magnusson N, Infanger M, Grosse J, Eilles C, Sundaresan A, Grimm D. The Impact of Simulated and Real Microgravity on Bone Cells and Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Res Int. Review* (2014)

**Aleshcheva G**, Sahana J, Ma X, Hauslage J, Hemmersbach R, Egli M, Infanger M, Bauer J, Grimm D. Moderate alterations of the cytoskeleton in human chondrocytes after short-term microgravity produced by parabolic flight manoeuvres could be prevented by upregulation of BMP-2 and SOX-9. *FASEB J*. 2015. pii: fj.14-268151 [Epub ahead of print] (2015)

**Wehland M**, **Aleshcheva G**, Schulz H, Saar K, Hübner N, Hemmersbach R, Braun M, Ma X, Frett T, Warnke E, Riwaldt R, Pietsch P, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D. Differential gene expression of human chondrocytes cultured under short-term altered gravity conditions during parabolic flight maneuvers. *Cell Commun. Signal*. 13. 18 (2015)

Riwaldt S, Pietsch J, Sickmann A, Bauer J, Braun M, Segerer J, Schwarzwälder A, **Aleshcheva G**, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D: Identification of proteins involved in inhibition of spheroid formation under microgravity. *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.201500067 [Epub ahead of print] (2015)

**Aleshcheva G**, Bauer J, Hemmersbach R, Egli M, Grimm D: Tissue engineering of cartilage on ground-based facilities. *Microgravity Sci. Technol.* [In Review]

**Aleshcheva G**, Sahana J, Bauer J, Hemmersbach R, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D: Scaffold-free tissue engineering of cartilage using a Rotating Wall Vessel. *Tissue Eng. Part B* [In Review]

**Aleshcheva G**, Sahana J, Hemmersbach R, Egli M, Bauer J, Infanger M, Grimm D: Tissue Engineering of cartilage in simulated microgravity produced on a 3D Random Positioning Machine. *Nature* [In preparation]

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Der Einfluss der Gravitation auf humane Chondrozyten – Tissue Engineering des Knorpels“**

in der Klinik für Plastische, Ästhetische und Handchirurgie

ohne Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation außer den genannten Hilfsmitteln keine weiteren benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

## **Darstellung des Bildungsweges**

nur in der Druckversion vorhanden